

Universidad Miguel Hernández de Elche
Instituto de Biología Molecular y Celular

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Evaluación de una terapia enzimática antitumoral en diferentes modelos celulares quimioresistentes.

Paola Lucero Calabuig

Grado en Biotecnología , 2014-2015

Facultad de Ciencias Experimentales

TUTORES

Miguel Saceda Sánchez y Vicente Micol Molina

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Índice

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS -----	1
RESUMEN -----	2
1. INTRODUCCIÓN -----	4
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS -----	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS -----	11
3.1 Transformación y cultivo de las cepas bacterianas-----	11
3.2 Expresión y purificación de Clyt DAO-----	11
3.3 Dialización de la DAO y medida de su actividad-----	12
3.4 Inmovilización de la DAO en nanopartículas magnéticas-----	13
3.5 Preparación de los liposomas, inmovilización de la DAO y determinación de la actividad-----	14
3.6 Comprobación de la encapsulación de la DAO en los liposomas-----	17
3.7 Cuantificación de la DAO encapsulada en el interior del liposoma-----	18
3.8 Líneas celulares utilizadas-----	19
3.9 Preparación de placas para tratamientos-----	19
3.10 Tratamientos radioterápicos-----	19
3.11 Ensayos de proliferación celular-----	20
3.12 Ciclo celular-----	20
3.13 Estudio de la producción de radicales libres -----	21
3.14 Determinación del porcentaje de Histona H2A.X activada-----	21
4. RESULTADOS -----	22
4.1 OBJETIVO 1: Determinar si la DAO encapsulada en liposomas mantiene su actividad biológica y comparar dicha actividad con la obtenida mediante otros métodos de vehiculización de la enzima.-----	23
4.2 OBJETIVO 2 Evaluar diversos tratamientos como posibles potenciadores de la DAO y la radioterapia en cultivos primarios de glioblastoma y líneas celulares de carcinoma de páncreas.-26	
4.2.1 Evaluar la enzima D-aminoácido oxidasa como posible potenciadora de la radioterapia, por la generación de ROS.-----	27
4.2.2 Determinar la posible potenciación de la radioterapia con nanopartículas de oro sobre cultivos primarios de glioblastoma.-----	29
4.3 OBJETIVO 3 Evaluar si los inhibidores de PARP pueden también potenciar el efecto generado por la DAO.-----	31
5. DISCUSIÓN -----	33
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA -----	35
7. BIBLIOGRAFÍA -----	37

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ClytA: Dominio C-terminal de la amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina

DAO: D-aminoácido oxidasa

DEAE: Dietilaminoetanol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

ϵ : Coeficiente de extinción molar

FAD: Dinucleótido de adenina-flavina

GPX: Glutación peroxidasa

HGUE: Hospital General Universitario de Elche

IBMC: Instituto de Biología Molecular y Celular

IPTG: Isopropyl- β -D-1-tiogalactopiranosido

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio

PBS: Tampón fosfato salino

P/V: Relación peso/volumen

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Rpm: Revoluciones por minuto

BSA: Albúmina de suero bovino

SD: Desviación estándar

SOD: Superóxido dismutasa

LMG: Vesículas multilamelares grandes.

LUG: Vesículas unilamelares grandes.

LUP: Vesículas unilamelares pequeñas.

ROS: especie reactiva del oxígeno

PARP: poli adenosin fosfato ribosa (ADP-ribosa) polimerasa

SFB: Suero fetal bovino

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de la enzima D-aminoácido oxidasa (DAO) vehiculizada en liposomas sobre distintos tipos de líneas celulares tumorales resistentes al tratamiento quimioterápico.

La DAO cataliza la oxidación de D-aminoácidos, produciendo los correspondientes alfa-cetoácidos, amonio y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es un productor de especies reactivas del oxígeno, que generan estrés oxidativo. El uso de esta enzima tiene un gran interés como posible terapia enzimática, puesto que es posible regular la producción de especies reactivas del oxígeno añadiendo de forma exógena los D-aminoácidos que de forma natural no están presentes en el organismo.

En este trabajo se ha corroborado que efectivamente la DAO induce la muerte celular en las líneas tumorales cuando está libre, tal y como se había demostrado en estudios anteriores, además también se ha comprobado que, inmovilizada en nanopartículas magnéticas la enzima presentaba una mayor estabilidad y eficacia. Por otro lado, hemos evaluado si diferentes métodos de vehiculización podrían inducir un aumento en la eficacia y estabilidad de la DAO.

Alternativamente, hemos evaluado el valor de la radioterapia y de los inhibidores de poli adenosin fosfato ribosa (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) como posibles métodos para potenciar el efecto de la DAO, así como las nanopartículas de oro para la potenciación de los tratamientos radioterápicos. La radioterapia genera radicales libres y los inhibidores de PARP favorecen que no haya reparación adecuada del daño en el ADN generado por los radicales libre.

Palabras clave: D-aminoácido oxidasa, liposomas, nanopartículas de oro, nanopartículas magnéticas, inhibidores de PARP, radioterapia.

SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the effect of the D-amino acid oxidase enzyme (DAO) immobilized in liposomes on different types of tumor cellular lines resistant to the chemotherapeutic treatment.

D-amino acid oxidase catalyzes the oxidation of D-amino acids, producing alpha-keto acids, ammonia and H_2O_2 . H_2O_2 generates reactive oxygen species (ROS) leading to oxidative stress. The use of this enzyme as therapy against cancer is of great interest because its substrate, the D-amino acids

are not found endogenously in the organism, being possible to regulate the production of H_2O_2 in the tumor cells by controlling the administration of the substrate.

According to previous studies, we corroborate that DAO induces the cellular death in tumor cell lines, moreover it is shown that the stability and efficacy increases when it is immobilized in magnetic nanoparticles. On the other hand, we have evaluated if different vehiculization methods could induce an increase in the stability and efficacy of DAO.

Alternatively, we have evaluated the possibilities of radiotherapy and poly ADP ribose polymerase (PARP) inhibitors as a possible method for strengthening the DAO effect and gold nanoparticles as a possible strengthener for the radiotherapy. Radiotherapy generates free radicals and PARP inhibitors inhibit the adequate reparation of the DNA damage generated as a response to the ROS generation.

Keywords: D-amino acid oxidase, liposomes, gold nanoparticles, magnetic nanoparticles, PARP inhibitors, radiotherapy.



1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que la división celular se produce sin control y las células afectadas son capaces de invadir otros tejidos. En condiciones normales, las células crecen y se dividen de forma controlada, y cuando están senescentes o dañadas, mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, en ocasiones el material genético puede sufrir mutaciones que afectan al crecimiento normal y a la división celular, de forma que las células dañadas no mueren y finalmente dan lugar a un tumor (Fig. 1)[1].

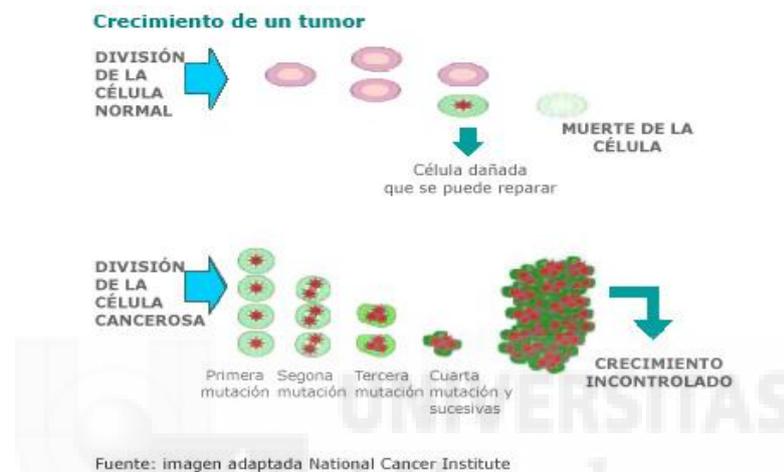


Figura 1. Diferencias entre la división de la célula normal y la célula cancerosa.

Cuando las células crecen sin control, en la mayoría de los casos se desencadena el fenómeno de la metástasis, las células se separan del sitio donde inicialmente se formaron, desplazándose por el sistema sanguíneo y/o linfático hacia otras partes del cuerpo formando nuevos tumores.

Una vez que el tumor primario ha metastatizado, la esperanza de vida es muy baja. Si nos fijamos en los datos actuales, el cáncer constituye actualmente una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. La incidencia global prevista de cáncer para la población española durante este año 2015 es de 222.069 personas (136.961 hombres y 85.108 mujeres), siendo el tipo más frecuente el cáncer colorrectal, por delante, del cáncer de pulmón y del cáncer de mama.

En la actualidad, los tratamientos anticancerígenos convencionales son la radioterapia, la quimioterapia, la cirugía y el trasplante de células madre [2]. Algunas de estas terapias presentan una selectividad bastante baja, asociándose con importantes efectos secundarios. Por otro lado, en la mayoría de los casos resulta difícil la eliminación completa del tumor, apareciendo células resistentes. La accesibilidad del fármaco constituye un problema adicional, ya que debido al excesivo

crecimiento celular, aparece una pobre vascularización [3]. En algunos casos aparece necrosis y además hay que tener en cuenta que cada tumor es único y diferente con lo cual presentan una variedad histológica muy grande [4].

Por lo expuesto, resulta evidente que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer constituye uno de los objetivos prioritarios de la investigación oncológica, siendo de especial interés las denominadas terapias dirigidas que presentan una serie de ventajas importantes frente a las terapias convencionales comúnmente utilizadas en oncología [5].

- Las terapias dirigidas actúan en blancos moleculares específicos que están asociados con el cáncer, mientras que la mayoría de los tratamientos convencionales actúan en todas las células con una elevada tasa de división, ya sean cancerosas o normales.
- Las terapias dirigidas son con frecuencia citostáticas, es decir bloquean el crecimiento celular, mientras que los tratamientos convencionales son citotóxicos.

Una estrategia muy novedosa en el campo de las terapias dirigidas es la terapia enzimática que consiste en dirigir la enzima hacia el tumor y una vez ahí, suministrar en forma de profármaco no tóxico el sustrato de dicha enzima, para que ésta transforme el profármaco en fármaco activo en el tumor.

Un posible mecanismo de acción de la enzima sería la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que afectan a la funcionalidad y fisiología celulares [6,7]. Un aumento de ROS genera estrés oxidativo, produciendo daños en el ADN, así como oxidación de los ácidos grasos y los aminoácidos afectando a la supervivencia no sólo de las células cancerosas sino también a la supervivencia de las células normales [3,8]. Una de estas ROS que se generan con este tipo de terapias es el H_2O_2 , que atraviesa la membrana y produce daños por oxidación directa en el ADN y en las proteínas induciendo además a las células a entrar en apoptosis [9,10].

La inmovilización de la enzima sobre un soporte, puede aumentar tanto la especificidad de la direccionalidad de la enzima, como su estabilidad. De esta forma pueden producirse una serie de cambios que afecten a la cinética, y a sus características bioquímicas y mecánicas, favoreciendo que la enzima se mantenga por más tiempo activa y que se pueda dirigir de una forma más específica [11]. Por otro lado, la toxicidad asociada a los agentes quimioterapéuticos convencionales, dificulta su utilización a dosis elevadas, problema que quedaría en parte solventado con la inmovilización en estructuras tales como liposomas, permitiendo un aumento en el índice terapéutico del fármaco.

Existen diversos métodos de inmovilización que se clasifican en métodos de inmovilización por retención física o por unión química [12].

Existen dos tipos de inmovilización por retención física, el primero de ellos es el atrapamiento, y el segundo tipo es la inclusión en membranas o microencapsulación. Ambos son sistemas de inmovilización enzimáticos irreversibles, ya que cuando la enzima se une al soporte no podrá separarse de él a menos que rompa dicho soporte o pierda su actividad [12] (fig. 2). Los métodos de inmovilización por unión química se dividen igualmente en dos tipos, por un lado la unión a soportes y por otro lado, el reticulado [12]. En ambos casos la unión a soportes o el reticulado se puede producir bien mediante métodos de inmovilización enzimáticos reversibles (en los que la enzima se puede eluir del soporte sin afectar su actividad) o irreversibles (fig. 2).



Figura 2. Métodos de inmovilización físicos y por unión química.

La nanotecnología constituye una disciplina en constante expansión. Los nanomateriales tienen una gran importancia debido a su tamaño a escala nanométrica, de ahí que las nanopartículas magnéticas sean consideradas como un sistema de soporte de inmovilización muy interesante, gracias a que proporciona una mayor área superficial funcional que le permite a la enzima aumentar la carga, mejorar su biodisponibilidad y aumentar la solubilidad de la enzima, además no tienden a deformar la estructura de la enzima gracias al aumento en la interacción enzima-soporte [13].

Otros sistemas interesantes de vehiculización son los liposomas, vesículas cuya composición química está constituida básicamente por uno o varios tipos de fosfolípidos y colesterol que se integran en una o más bicapas, conformando un espacio central acuoso y en ocasiones espacios interlaminares. Pueden además estar constituidos por otros componentes aparte de los ya mencionados [14].

La naturaleza de los fosfolípidos es esencial en la formación de liposomas. Los fosfolípidos son moléculas anfífilas cuya parte hidrofóbica (cabeza apolar) está formada por dos o más colas hidrocarbonadas de ácidos grasos, por lo tanto esta región es neutra e insoluble en agua, pero soluble en grasas. Su parte hidrofílica (cabeza polar) está formada por un grupo fosfato y un alcohol, de forma que tiene carga eléctrica y es atraída por el agua (parte hidrófila). Por lo tanto, en

disolución acuosa estas moléculas se autoensamblan con el fin de minimizar las repulsiones de las partes hidrofóbicas con el agua, generando así estructuras que pueden ir desde micelas hasta liposomas y microtubos [15] (fig. 3).

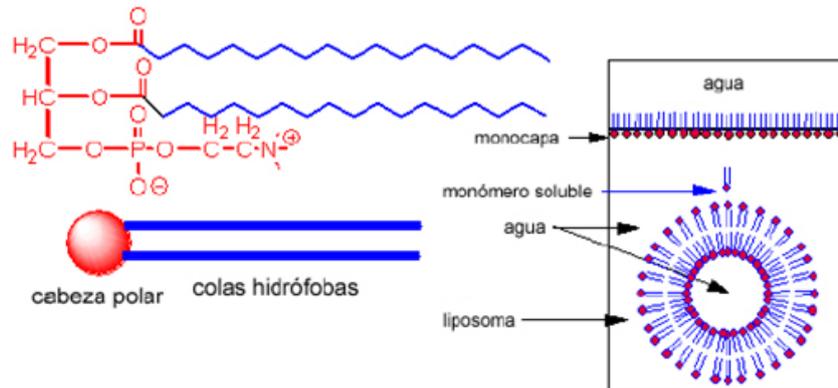


Figura 3. Esquema de moléculas anfifílicas de cadena simple y doble [15].

Un factor importante para la generación de los liposomas es la denominada temperatura de transición de fase (T_c), que es aquella en la que las cadenas de ácidos grasos se funden pasando de fase gel a líquido-cristalino. Los liposomas se formarán correctamente sólo cuando la temperatura sea superior a la T_c de los lípidos que lo forman, de ahí la importancia de conocer dicha temperatura [15].

Existen diferentes tipos de liposomas en función de su estructura y el número de capas concéntricas (fig. 4) [15]:

- **Liposomas multilamelares grandes (LMG):** Los tamaños de estos liposomas suelen ser mayores de 3000nm. Poseen aproximadamente cinco o más láminas concéntricas con sus correspondientes espacios acuosos.
- **Liposomas unilamelares pequeños (LUP):** su diámetro oscila entre 25-50nm. Contienen una única bicapa y se obtienen a partir de los anteriores por sonicación.
- **Liposomas unilamelares grandes (LUG):** Su diámetro oscila entre los 50-1000nm y contienen una única bicapa.

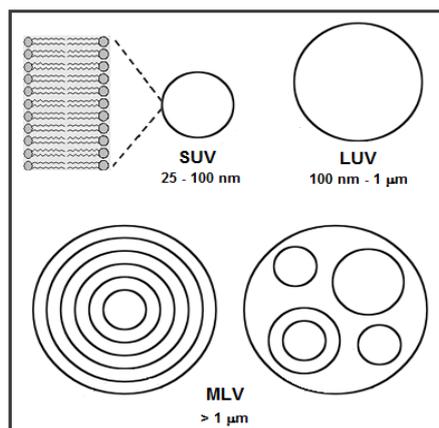


Figura 4. Tipos de liposomas en función de su tamaño y número de capas.

Los modelos liposómicos han abierto interesantes perspectivas futuras debido a su funcionalidad, versatilidad, baja toxicidad y biodegradabilidad, además no son irritables y pueden incorporar moléculas tanto de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica [15].

En cuanto al efecto de las enzimas generadoras de radicales libres, se podría potenciar al combinarlas con otros tratamientos como la radioterapia. La radioterapia se basa en la generación de radiaciones ionizantes que tienen la capacidad de producir radicales libres cuando interactúan con la materia y ceden la energía, de esta forma producen roturas en enlaces de moléculas biológicas, encontrándose entre las más susceptibles el ADN [16].

Otra vía de potenciación podría conseguirse con el uso de las nanopartículas de oro que junto con la radioterapia, inducen una serie de respuestas tales como la disminución de la supervivencia clonogénica, el incremento en la apoptosis y la inducción del daño en el ADN que puede estar mediado por la producción de especies reactivas del oxígeno. Además, gracias a su naturaleza permiten que la radiación que llega a la interfaz de estos tejidos sea mayor, ya que poseen un número atómico muy alto lo que incrementa la absorción fotoeléctrica de los rayos X en comparación con los tejidos normales sin estas nanopartículas [17].

La endocitosis parece ser el mecanismo fundamental para la absorción celular de las nanopartículas de oro, en concreto endocitosis mediada por receptor, por tanto el tamaño, la forma, la cubierta y la carga de la superficie van a influir en el proceso [17].

Otra posible potenciación de la enzima DAO se podría conseguir utilizando los inhibidores de PARP (polimerasa poli ADP ribosa), familia de enzimas que reparan el daño ocasionado al ADN por los fármacos antineoplásicos. La inhibición de PARP produciría en principio un aumento de la muerte celular ya que se dificulta que las células cancerígenas reparen su ADN dañado [18].

2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Inicialmente se utilizaron como enzimas generadoras de ROS xantina oxidasa y glucosa oxidasa en el tratamiento del cáncer [19]. Sin embargo, dichas enzimas presentaban la principal desventaja de que los sustratos que utilizaban se encontraban de manera endógena en el organismo y por lo tanto no era posible regular las concentraciones de los mismos. Además eran muy poco estables “in vivo”.

El siguiente paso fue buscar una enzima que no tuviera estas limitaciones, proponiéndose el uso de la D-aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodothorula gracilis* (EC 1.4.3.3) [20] que cataliza la oxidación de D-aminoácidos en sus correspondientes alfa-cetoácidos, amonio y H₂O₂ (Fig. 5) [21,22]. La DAO de las levaduras posee una actividad catalítica muy elevada, interacciona de manera estable con el cofactor FAD (dinucleótido de flavina-adenina), y su sustrato se debe añadir exógenamente, ya que los D-aminoácidos no se encuentran en el organismo de forma natural, de esta forma se puede regular la actividad de la enzima [19,23].

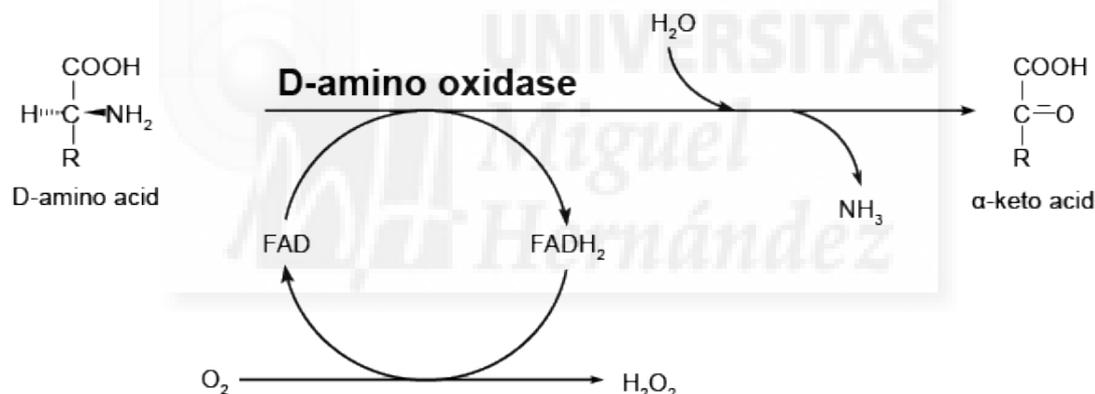


Figura 5. Mecanismo de acción de la D-aminoácido oxidasa.

En estudios previos de nuestro laboratorio, se utilizó la DAO funcionalizada con el dominio ClytA, que es el dominio C-terminal de unión a colina de la amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina (amidasa LYTA) sintetizada por *Streptococcus pneumoniae*. El dominio ClytA presenta una fuerte afinidad por la colina o por análogos de la misma, como el dietilaminoetanol [24]. Esta construcción tiene afinidad por las nanopartículas magnéticas, utilizadas en nuestro laboratorio como sistema de inmovilización y que habían sido funcionalizadas con dietilaminoetanol (DEAE).

Este método de inmovilización presenta múltiples ventajas tales como poder dirigir el tratamiento de forma más específica a su sitio de acción, la ausencia de citotoxicidad lo que hace que disminuyan los efectos secundarios, una mayor estabilización de la enzima, etc.

En nuestro estudio hemos comparado este método de inmovilización con la utilización de liposomas.

Hemos tratado de determinar si puede potenciar el efecto de la quimioterapia y/o radioterapia en tumores resistentes al tratamiento el uso de la terapia enzimática (utilizando la DAO) combinada con la utilización de soportes de diverso origen (nanopartículas magnéticas, liposomas), así como la potenciación de la DAO con otros tratamientos (inhibidores de PARP, radioterapia, nanopartículas de oro). Pero más concretamente los objetivos específicos son:

OBJETIVO 1: Determinar si la DAO encapsulada en liposomas mantiene su actividad biológica y comparar dicha actividad con la obtenida mediante otros métodos de vehiculización de la enzima.

OBJETIVO 2: Evaluar diversos tratamientos como posibles potenciadores de la DAO y la radioterapia en cultivos primarios de glioblastoma y líneas celulares de carcinoma de páncreas.

2.1: Evaluar la enzima D-aminoácido oxidasa como posible potenciadora de la radioterapia, por la generación de ROS.

2.2: Determinar la posible potenciación de la radioterapia con nanopartículas de oro sobre cultivos primarios de glioblastoma.

OBJETIVO 3: Evaluar si los inhibidores de PARP pueden también potenciar el efecto generado por la DAO.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Transformación y cultivo de las cepas bacterianas

Se utiliza la cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21(DE3) que contiene el plásmido pCPC21, de la que se obtiene la proteína de interés Clyt-DAO [25].

La transformación se realiza añadiendo 0,5µl de plásmido pCPC21 a 100µl de *E.coli* BL21. La mezcla se incuba durante 20 minutos en hielo, realizando a continuación un choque térmico de 2 minutos a 37°C con el fin de permeabilizar las membranas. Pasado este tiempo se dejan otros 5 minutos en hielo y a continuación se añade 1 ml de medio de Luria-Bertani (LB), tanto a las células control como a las células transformadas. La composición del medio es 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl. Las células se incuban en este medio durante 1 hora en un baño a 37°C con el objetivo de que puedan expresar la resistencia al antibiótico. Concluido este tiempo, los tubos se agitan y se siembran en 3 placas: En la primera placa se siembran 100µl de las células transformadas, a continuación, se centrifugan los dos tubos 5 minutos a 5000rpm, se elimina el sobrenadante por decantación y se resuspenden en el mínimo volumen de sobrenadante remanente, de forma que en la segunda y tercera placas se siembran las células control y las transformadas, respectivamente. Finalmente, se dejan las placas en la estufa para que crezcan las colonias.

A continuación se prepara un precultivo, realizando un raspado de las bacterias que se deposita sobre un matraz que contiene 10 ml de LB con ampicilina a 1 g/ml. Una vez añadido se deja toda la noche a una temperatura de 37°C y con una agitación orbital de 190 rpm (Innova™ 4000). Tras esta incubación, el contenido se vierte sobre otro matraz que contiene 1L de LB y Ampicilina a 1 g/ml, dejándose a una temperatura de 37°C, con agitación de 190 rpm. Aproximadamente dos horas después, se realiza una valoración del crecimiento, que se lleva a cabo por turbidimetría a 600nm utilizando un espectrofotómetro "Evolution 201" (Thermo Scientific). Esta valoración se realiza hasta que se alcanza la densidad óptica adecuada, que indica el crecimiento que estamos buscando.

3.2 Expresión y purificación de Clyt DAO

Cuando la valoración llevada a cabo por turbidimetría a 600nm alcanza la densidad óptica de 0,6, se habrá alcanzado la fase de crecimiento que buscamos, que es la fase exponencial. En este momento, se añaden 0,5 ml de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M, ya que la concentración final a la que debe estar es a 0,5mM. El IPTG es el sustrato que la bacteria necesita para producir la enzima. La mezcla se incuba durante toda la noche a 30°C.

La elección de esta temperatura responde al hecho de que la enzima es ligeramente insoluble por lo que, a mayores temperaturas corremos el riesgo de que precipite y de que el plegamiento no sea el correcto. Tras la incubación, la mezcla se centrifuga durante 10 minutos, a una temperatura de 4°C y a 5000 rpm (Avanti® J-26XP, Beckam Coulter). El sobrenadante se elimina por decantación y el precipitado se resuspende en un tampón compuesto por fosfato sódico 20mM pH 7.5 con 20 % de glicerol (P/V), este último aumenta la estabilidad de la enzima. Se añaden además 0,5 ml de di-nucleótido de adenina-flavina (FAD) 10mM que actúa como cofactor de la enzima.

A continuación, las células se someten a 10 ciclos de sonicación (Branson 250) de 15 segundos cada ciclo y a una temperatura de 4°C, con el fin de lisarlas y de que liberen su contenido intracelular. Tras los ciclos de sonicación, las células se centrifugan durante 10 minutos a 9000 rpm a una temperatura de 4°C y el sobrenadante se purifica mediante cromatografía de afinidad.

La columna utilizada para el proceso de purificación de la DAO posee un lecho constituido por 5g de DEAE-celulosa en tampón de equilibrado constituido por fosfato sódico 20mM, pH 7.5 con 20% de glicerol. Una vez cargada nuestra muestra en la columna, se añade el tampón de lavado (fosfato sódico 20mM, pH 7.5, 20% glicerol, NaCl 1.5M) para eliminar todo aquello que no sea la proteína de interés (impurezas). Por último se añade el tampón de elución (fosfato sódico 20mM, pH 7.5, 20% glicerol, 1.5M de NaCl y 140mM de colina al 2% (P/V)). La colina compite con el DEAE por el dominio ClytA, permitiendo que la DAO eluya de la columna.

3.3 Dialización de la DAO y medida de su actividad

Cuando se va a inmovilizar la DAO en nanopartículas magnéticas hay que dializarla ya que se debe eliminar la colina, de forma que quede libre el dominio ClytA, que es afín al DEAE de estas nanopartículas. Este paso no se requiere cuando la inmovilización se lleva a cabo en los liposomas.

Para llevar a cabo la diálisis, se preparan 2 litros de tampón de fosfato sódico 20mM, pH 7.5 y glicerol 10%. La enzima se introduce en la bolsa de diálisis y se mantiene en agitación a 4°C con 0,5 ml del tampón. Transcurridas 2 horas, se hace un cambio del tampón y esto se repite hasta cuatro veces. Una vez llevado a cabo este proceso la colina se habrá eliminado, lo que puede contribuir a que la proteína precipite, por dicho motivo es importante centrifugar tras la diálisis, la centrifugación se realiza a 13000 rpm, durante 3 minutos a 4°C. El precipitado se desecha y en el sobrenadante determinamos la concentración de proteínas, utilizando el espectrofotómetro "Evolution 201" (Thermo Scientific). Se establece un rango de longitudes de onda que va de 240 a 320nm. Como blanco se utiliza el tampón de fosfato sódico 20mM, pH 7.5 y glicerol 10%. La absorción de la proteína tiene lugar a 280nm. La concentración de proteína se obtiene utilizando el coeficiente de

extinción molar teórico, 2,34 g/l (que se calcula con la secuencia primaria de la proteína a través del siguiente programa: ProtParam del servidor EXPASY, <http://web.expasy.org/protparam>). El siguiente paso una vez cuantificada es determinar la actividad de la proteína, para lo que se realiza una medida espectrofotométrica en el rango del UV-visible, y en este caso se cuantifica el producto de la reacción de la enzima con su sustrato.

Para la determinación de la actividad, se mezclan 10µg de la DAO, D-fenilglicina (sustrato de la DAO) 15mM y el tampón de fosfato sódico 20mM, pH 7.5 con 10% de glicerol. La reacción se lleva a cabo durante 10 minutos en agitación. A continuación se añade ácido acético glacial, para parar la reacción. En este proceso, parte de la enzima se podría haber desnaturalizado, por lo que centrifugamos a 13000rpm durante 3 minutos para que la enzima desnaturalizada precipite. El producto que se genera es el ácido benzoil-fórmico ($\epsilon_{252} = 12253 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que se determina a 252nm. Con el valor obtenido podremos calcular la actividad enzimática. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1nmol de producto por minuto a 25°C y pH 7.5. Otro valor que es fundamental determinar es la actividad específica, que nos indica si la proteína está en buen estado o si por el contrario no la podemos utilizar. La proteína puede ser utilizada cuando su actividad específica se encuentre en el rango 3500 y 4500 nmol/min•mg.

Por último, antes de la inmovilización y de la utilización del enzima, es necesario filtrarla.

3.4 Inmovilización de la DAO en nanopartículas magnéticas

Para la inmovilización de la DAO se han utilizado nanopartículas magnéticas comerciales (fluidMAG-DEAE, Chemicell) cuyo tamaño oscila alrededor de los 200nm y que están recubiertas de almidón que a su vez está funcionalizado con DEAE, que es el que presenta afinidad por el dominio Clyt de la proteína de fusión Clyt-DAO. En ensayos anteriores se vio que si se aumentaba la cantidad de Clyt-DAO, la concentración que se encapsulaba era cada vez mayor, hasta un límite de $70 \pm 5 \mu\text{g}$ de Clyt-DAO por miligramo de nanopartícula magnética ensayada. En nuestros ensayos siempre ponemos en exceso la cantidad de proteína de fusión.

El primer lugar, se procede al lavado de las nanopartículas, mezclando 5 mg de enzima (200µl) con 1 ml de tampón de fosfato sódico 20mM, pH 7.5 con 10% de glicerol. Con la ayuda de un imán se separan las nanopartículas y se retira el tampón que hemos añadido volviendo a añadir nuevo tampón. Este lavado se realiza tres veces en condiciones de esterilidad. Tras los lavados, añadimos a las nanopartículas 500µg de enzima y 1 ml del tampón anterior. Paralelamente hay que preparar un control que contenga la misma cantidad de nanopartículas y el tampón. Ambos tubos se

agitan durante 10 minutos y transcurrido este tiempo se vuelve a realizar un lavado para eliminar la proteína no unida.

El siguiente paso es la realización de los ensayos de la actividad enzimática anteriormente explicados. Las determinaciones de actividad se realizan en 10µl de cada uno de los tubos (3-10µg de enzima). Es imprescindible separar previamente las partículas magnéticas con ayuda de un imán, puesto que podrían influir en la lectura.

3.5 Preparación de los liposomas, inmovilización de la DAO y determinación de la actividad

En primer lugar, se prepara el stock de lípidos, mezclando el fosfolípido de interés con un disolvente orgánico. En nuestro caso, hemos utilizado como fosfolípido la fosfatidilcolina natural derivada de la yema de huevo ("Egg Yolk L-α phosphatidylcholine" (EYPC)), formada por una mezcla de fosfolípidos saturados e insaturados de distintas longitudes, suministrada por lipid y que posee una pureza de alrededor del 99% [15] (Tabla 1).

	Fórmula molecular	Nº de carbonos en las colas	Peso molecular (g/mol)	Tª de transición (T_c) °C
EYPC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	16, 18 y 20	760.09	-17 < T _c < -5 °C

Tabla 1 . Componentes de la fosfatidilcolina de la yema de huevo [15].

Como disolvente orgánico, utilizamos una mezcla 1:1 de cloroformo : metanol [15]. El stock se ha preparado a una concentración de 12mM. En muchas ocasiones pueden producirse desfases entre la concentración de la disolución preparada y la concentración real debido a errores de manipulación. Para evitar esto una vez mezclado disolvente orgánico y lípidos se procede a la realización del ensayo de determinación de fosfato o método de Fiske. El método de Fiske es una prueba que se realiza para la determinación de lípidos a través de la cuantificación de su grupo fosfato (Bötcher, et al. 1961. Anal. Chim. Acta 24, 203-204). Para realizar este ensayo se necesitan los siguientes reactivos: P_i (K₂HPO₄) estándar 0.4mM (disuelto en agua), HClO₄ al 60%, Reactivo de Molibdato: 2,2 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ *4H₂O + 14,3 ml H₂SO₄ concentrado, por litro de disolución, ácido ascórbico (Sigma Aldrich) 10% (se disuelve 1 g en 10 ml de agua destilada).

Con dichos reactivos se preparan 7 tubos, con los que se hace la recta patrón además de los tubos correspondientes a nuestras muestras, que a su vez se preparan por duplicado y nos sirven para determinar la concentración de lípidos, extrapolando la absorbancia obtenida sobre la recta patrón.

En primer lugar se añaden a los tubos los volúmenes correspondientes de P_i y de $HClO_4$. En las muestras se añaden 5 μ l del stock de lípido. A continuación, se colocan los tubos en el baño de arena o un bloque térmico a 180-190°C durante 30 minutos. Se dejan enfriar y se añade el molibdato y posteriormente el ácido ascórbico mientras se agitan en el vórtex. Finalmente se dejan durante 10 minutos en agua hirviendo para que se produzca el cambio de color de amarillo a azul verdoso y así poder determinar la absorbancia a 812nm. Con los valores obtenidos se construye la recta patrón sobre la que se extrapolan los valores de absorbancia determinados en nuestra muestra.

En ensayos celulares, se ha demostrado que la concentración lipídica que resulta inocua para las células está en el orden de 0,125mM, por lo que se trabaja con la cantidad adecuada de stock que nos permite alcanzar dicha molaridad y evitar su posible efecto citotóxico.

A continuación se lleva a cabo el proceso de obtención de los liposomas unilamelares grandes (LUG), que son las estructuras en las que estamos interesados puesto que el volumen de encapsulación es mucho mayor que el de otros tipos de liposomas. Su obtención se lleva a cabo mediante el método de dispersión simple, que consta de varias etapas [26] (fig. 6):

En primer lugar, hay que liofilizar o evaporar los lípidos disueltos en disolventes orgánicos, para ello primero se aplica una corriente de N_2 y a continuación, una bomba de vacío durante aproximadamente 2 horas. El siguiente paso es la hidratación que se realiza por encima de la temperatura de transición del lípido y consiste en añadir un medio tamponado acuoso (tampón de fosfato sódico 20mM, pH 7.5 con 10% de glicerol) sobre la película de lípido seco, de esta forma parte del agua queda atrapada en la bicapa lipídica y el resto queda inmerso en el interior del liposoma que se forma espontáneamente en contacto con la disolución acuosa. Para que este paso genere liposomas lo más homogéneos posible, es necesario llevar a cabo 5 ciclos de congelación y descongelación. Primero el tubo se congela a -20°C durante 20 minutos y luego se pone en el thermomixer (comfort) a 37°C y 500 rpm, con estos ciclos se consigue un total desprendimiento de los fosfolípidos de las paredes del tubo.

Los liposomas obtenidos de esta manera, son los conocidos como multilamelares grandes, pero como hemos mencionado anteriormente, nos interesan los liposomas unilamelares grandes, por lo que el siguiente paso es la etapa conocida como extrusión y se lleva a cabo mediante el instrumento llamado "LiposoFast".

El "LiposoFast"(fig. 7) produce los liposomas unilamelares grandes mediante un proceso manual de extrusión haciendo pasar la suspensión de liposomas multilamelares a través de una jeringuilla de cristal que cuando se aplica presión dirige la suspensión hacia una membrana de

policarbonato (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membranes) de tamaño de poro definido, en este caso una membrana de diámetro 25 mm y tamaño de poro de 0,1µm, de modo que la suspensión pasa a la otra jeringuilla de cristal y hay que volver a aplicar presión para que vuelva a atravesar la membrana. Para conseguir la completa formación de LUG, se debe repetir el ciclo 30 veces.

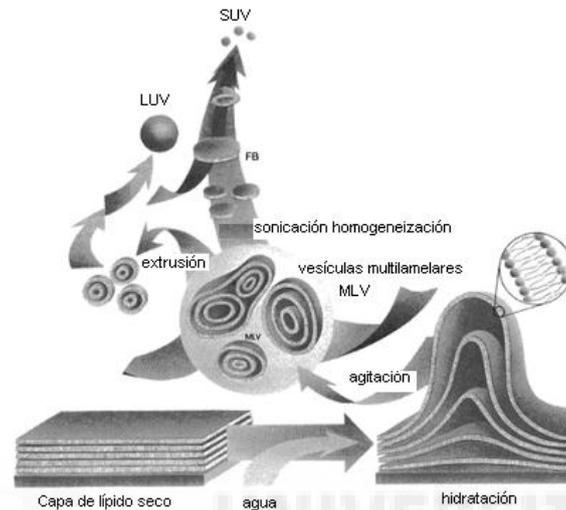


Figura 6. Proceso general para la preparación de liposomas [26].

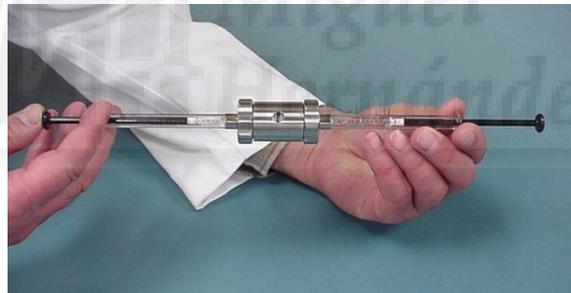


Figura 7. Liposofast.(La membrana está justo en el centro del cuerpo central de acero).

Finalmente se obtienen los LUG que deben almacenarse a 4°C, para evitar que se fusionen entre ellos y vuelvan a formarse los LMG. Estos LUG, debido a su composición lipídica solamente permanecen estables durante aproximadamente 24 horas, pasadas las cuales comienzan a sufrir fenómenos de agregación y/o fusión que provocan la pérdida de su tamaño original, dando lugar de nuevo a la formación de los LMG.

El proceso de vehiculización de la enzima en los liposomas es similar al descrito anteriormente. Se prepara el stock de lípidos y se liofiliza, añadiendo a la película de lípido seco el tampón acuoso (fosfato sódico 20mM, pH 7.5 con 10% de glicerol) y en ese momento se añade también la enzima (50 U/ml). Los ciclos de congelación y descongelación se omiten en este caso ya

que podrían afectar a la actividad enzimática y solamente agitamos 2 minutos en el vórtex, obteniendo de ese modo los LMG con la enzima encapsulada. A continuación se procede a la obtención de los LUG tal y como se ha explicado anteriormente. En realidad, en este caso es necesario realizar un paso más. Se debe centrifugar (Biofuge primo) dos veces a 3000 rpm durante 15 minutos para separar los liposomas del material no encapsulado. Se introduce la suspensión de LUG en un amicon (Amicon®Ultra-4), estos tubos tienen dos compartimentos separados por una membrana de NMWL de 30KDa, de forma que al centrifugar lo que atraviesa la membrana y cae a la parte de abajo es aquello que no ha encapsulado y por tanto se desecha y lo que queda arriba será la parte de liposomas encapsulados. Para mantener la molaridad inicial se le añade la misma cantidad de tampón (fosfato sódico 20mM, pH 7.5 con 10% de glicerol) que se está desechando. Una vez hecho esto, los LUG están listos para ser utilizados. En este caso también se conservan a 4°C durante un periodo máximo de 24 horas.

El protocolo que se aplica para medir la actividad de la DAO encapsulada en los liposomas es prácticamente el mismo utilizado para la determinación de la actividad de la DAO libre, con la particularidad de que en este caso, el blanco utilizado debe de llevar liposomas sin enzima. Además, una vez preparados los liposomas y antes de empezar a cuantificar la proteína se debe añadir un detergente que rompa el liposoma y permita medir la actividad enzimática. Para decidir que detergente usar, hemos determinado la actividad de la DAO libre con varios de ellos y la mayoría no disminuyen su actividad con respecto a la observada sin detergente de modo que hemos elegido uno al azar. El detergente utilizado ha sido CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) al 0,5 %.

3.6 Comprobación de la encapsulación de la DAO en los liposomas

Con el fin de determinar si la DAO encapsulada afecta al tamaño de partícula de los liposomas, se realiza una medición del tamaño de partícula mediante difracción láser, más concretamente conocido como “Low Angle Laser Ligth Scattering” (LALLS) (de Brookhaven instruments).

El rango de detección de partículas oscila entre 0.3nm y 6µm. Su metodología se basa en la propiedad de que el ángulo de difracción es inversamente proporcional al tamaño de partícula [27].

El aparato utilizado consta de un detector de fotodiodo de avalancha (APD) con una estructura muy fina, tipo diapositiva de sílica fotosensible que dispone de un número óptimo de detectores, los cuales, dirigen la señal a un fotomultiplicador que incrementa la resolución. La señal, finalmente llega a un correlador de señal que traduce la información, que de forma inicial incide

sobre los detectores. La medida de luz dispersada, se realiza a dos ángulos, uno de ellos a 90°, para conferir una mayor sensibilidad en la detección de partículas con mayor tamaño [27].

Para comenzar la medida, la muestra debe ser diluida correctamente e introducida en el aparato, a continuación se ajustan los parámetros y comienzan los ciclos de medida, tras esto nos fijamos en una serie de parámetros que son los que nos proporcionan la información que estamos buscando. Dichos parámetros son la polidispersidad y el diámetro. La polidispersidad indica el grado de variación en una campana Gaussiana de los pesos moleculares de los componentes, de modo que valores por debajo de 0,2 indican que tenemos una única población y por encima de 0,3 que hay más de una población. Por tanto en el primer caso significaría que la enzima se ha encapsulado correctamente y en el segundo caso que está fuera de los liposomas y no se ha encapsulado, de modo que una población correspondería a la enzima y la otra a los liposomas. El diámetro también debe ser valorado, los valores normalmente deben de aparecer en el rango entre 155-165nm, y no deben cambiar mucho con la encapsulación, ya que al encapsularse la afinidad entre ambos mantiene el mismo tamaño, y es esa afinidad precisamente lo que estamos buscando.

3.7 Cuantificación de la DAO encapsulada en el interior del liposoma

Con el fin de determinar qué cantidad de DAO finalmente queda encapsulada en el interior del liposoma utilizamos el ensayo Bradford. Este ensayo se basa en la interacción química entre el azul de Coomassie G-250 y aminoácidos básicos y aromáticos de la proteína. Esta unión colorante-proteína hace que se produzca un desplazamiento del espectro de 465nm (rojo) a 595nm (azul), que es la longitud de onda a la que se mide el complejo. Estos cambios de color son producidos por un cambio en la carga neta de la molécula que es debido a la relación entre grupos amino y sulfonato entre las formas libres y asociadas debido a las diferencias en los pH en los entornos en los que se encuentra el colorante.

Para llevar a cabo esta prueba se preparan por una parte 7 tubos que nos dan la absorbancia para construir la recta patrón y por otro lado un número de tubos que contienen las muestras por duplicado. En todos los tubos se añade como patrón BSA (albúmina de suero bovino)(Sigma Aldrich) preparado a una concentración de 0,1 mg/mL y PBS 1X y 5µl de muestra en los tubos correspondientes.

Una vez añadido el reactivo Bradford (Sigma Aldrich), esperamos 15 minutos y medimos la absorbancia a 595nm de todos los tubos. Con los datos de absorbancia se construye la recta patrón y extrapolando las absorbancias obtenidas de nuestras muestras sabemos la concentración de proteína. Estos valores cambian cada vez que se realizan nuevos liposomas, pero el dato que

obtenemos cada vez de μg de proteína encapsulada, sirve para comparar con los μg de proteína que se ponen inicialmente y ver cuál es el porcentaje de encapsulación. En la mayoría de los casos el porcentaje de lo que se encapsula está alrededor del 93%.

3.8 Líneas celulares utilizadas

Las líneas celulares que se han empleado durante este estudio proceden de distintos tipos de tumores. Hemos utilizado líneas celulares procedentes de carcinoma de páncreas exocrino humano (M220 (IMIM-PC-2), HS766T y RWP-1), una línea celular de adenocarcinoma de colón humano (SW480) y líneas celulares de glioblastoma multiforme humano (T98 y U87). Hemos utilizado también en este estudio, cultivos primarios obtenidos a partir de lavados intraoperatorios de pacientes con glioblastoma multiforme (HGUE-GB-16, HGUE-GB-17 y HGUE-GB-18).

Las líneas celulares HGUE-GB-16, HGUE-GB-17, HGUE-GB-18, T98 y U87 fueron obtenidas del Hospital General Universitario de Elche (HGUE) y las líneas SW480, RWP-1, HS766T y M220 fueron proporcionadas por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas de Barcelona (IMIM).

Las líneas celulares se mantienen en cultivo en presencia de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con Piruvato sódico (BioWhittaker) a una concentración final de 1mM y suero fetal bovino (SBF) en una proporción del 10%, a 37°C y en una atmósfera del 5% de CO₂. Para el mantenimiento de los cultivos primarios se utiliza como medio de cultivo DMEM/F12, el cual presenta la misma composición, pero enriquecida con la mezcla de nutrientes Ham's F-12.

3.9 Preparación de placas para tratamientos

Para iniciar los experimentos con las líneas celulares y con los cultivos primarios, dejamos que crezcan hasta alcanzar una confluencia del 80-90%, momento en el que se tripsinizan y se plaquean a las condiciones requeridas para cada experimento. Pasado un día después de la siembra, se aplica el tratamiento. Los tratamientos realizados en nuestros experimentos son : DAO libre, DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas, DAO inmovilizada en liposomas, y DAO con el inhibidor de PARP EB-47 y en todos los casos se añade también la D-alanina. Como control hemos utilizado: medio, DAO libre, DAO inmovilizada en nanopartículas, liposomas, DAO inmovilizada en liposomas, D-alanina y el inhibidor de PARP EB-47. Todos los controles se añaden en las mismas cantidades que sus correspondientes tratamientos. Una vez tratadas se cultivan a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 o 72 horas, en función del tipo de experimento realizado.

3.10 Tratamientos radioterápicos

Bajo la supervisión de la empresa ERESA en el Hospital General Universitario de Elche y utilizando los protocolos radiofísicos establecidos por ésta, se lleva a cabo la irradiación de cultivos primarios de glioblastoma y de líneas celulares de glioblastoma multiforme combinado con el uso de nanopartículas de oro (20nm de diámetro, DO : 1, suspensión en 0,1mM PBS) (Sigma-Aldrich).

Como control ponemos una placa sin irradiar, en la que la mitad de los pocillos contienen solamente medio y la otra mitad, medio con nanopartículas de oro, así como placas irradiadas pero sin nanopartículas de oro, tanto a 7 Gy (Gray) como a 15 Gy. Los tratamientos que se han probado son nanopartículas con oro irradiadas a 7 Gy y 15 Gy, algunas se han dejado en cultivo 24 horas y otras 6 días tras la irradiación. Para preparar las placas para ser irradiadas, se quita el medio de cultivo y se le añaden 13 ml PBS (tampón fosfato salino) 1X con 5µl de nanopartículas de oro (en las que llevan las nanopartículas de oro, en el resto solo los 13 ml de PBS 1X) a cada pocillo en placas de 6 pocillos. El PBS se pone cubriendo completamente el pocillo, por dos razones; cuando se irradia debe llegar la radiación a todas las células por igual y además debe simular las condiciones fisiológicas (sustituyente del suero fisiológico).

3.11 Ensayos de proliferación celular

El ensayo colorimétrico MTT, se utilizó para evaluar la supervivencia y proliferación celular. El ensayo permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, ya que se basa en la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, cuya acción es reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), una sal de tetrazolio de color amarillo, a un compuesto de color púrpura formazán, permitiendo así determinar el número de células viables, ya que es proporcional a la cantidad de púrpura formazán producido.

Para poder llevar a cabo este ensayo, se siguen los siguientes pasos: Se siembran placas de 96 pocillos y se dejan un día a 37°C y 5% de CO₂, tras esto se aplica cada tratamiento por sextuplicado. Tras 72 horas de tratamiento, se añade el reactivo MTT (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.25 mg/ml, durante 3 horas a las mismas condiciones. A continuación se elimina el medio completamente y se añaden 200µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich), con el objetivo de disolver los cristales de formazán generados, para ello se deja la placa en agitación durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Por último se mide la absorbancia en un lector de microplacas modelo Anthos 2001 a una longitud de onda de 570nm.

3.12 Ciclo celular

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, se determina mediante citometría de flujo. El ADN se marca con yoduro de propidio, agente intercalante fluorescente que se

excita a longitudes de onda de 480nm y emite fluorescencia roja a 620nm. Las células emiten más o menos fluorescencia en relación al contenido de ADN que tenga cada una, puesto que este fluoróforo se intercala en los ácidos nucleicos de las células.

Cuando las células se encuentran en la fase G2/M del ciclo celular poseen una dotación cromosómica 4n, ya que han superado la fase S de síntesis, por ello la fluorescencia que van a emitir es el doble que las que estén en fase G1 que tienen dotación cromosómica 2n. Las células que están en la fase S tendrán una señal intermedia entre la señal de G1 y la de G2/M. Las células muertas que poseen el ADN fragmentado, emiten menor fluorescencia que las células que poseen un ADN intacto.

Transcurrido el periodo de tratamiento, las células se tripsinizan y se centrifugan. El precipitado celular se fija en etanol al 70% durante al menos 1 hora a -20°C, tras lo cual, se centrifugan a 1100 rpm durante 5 minutos. Al precipitado de células se le añade 0,5 ml de una mezcla que contiene PBS-Triton al 0.5%, 25 g/ml de RNAsa y 25 g/ml de ioduro de propidio, dejándolas en oscuridad, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, empleando un citómetro Becka, Coulter EPICS XL, equipado con un láser de argón que excita a 388nm, se determina la distribución de fases del ciclo celular mediante citometría de flujo.

3.13 Estudio de la producción de radicales libres

La producción de radicales libres se determina mediante la utilización de la sonda fluorescente diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), capaz de unirse a dichos radicales libres. Los tratamientos se llevan a cabo en placas de 96 pocillos y, una vez concluidos, se introduce la sonda fluorescente. El tiempo de permanencia de dicha sonda varía en función del tiempo al que se quiera medir la producción de ROS. Una vez pasado el tiempo establecido, se retira el medio con el tratamiento y se lava la placa con PBS. Por último, se añade PBS y se mide en el lector de placas de fluorescencia POLARstar Omega (BMG Labtech).

3.14 Determinación del porcentaje de Histona H2A.X activada

La Histona H2A.X es un miembro de la familia de histonas H2A que actúa aguas abajo en la cascada de señalización kinasa del daño del ADN. La fosforilación de la Histona H2A.X en la serina 139 es un importante indicador del daño en el ADN. Conforme aumenta el daño en éste, se incrementa también el número de histona fosforilada H2A, acumulándose en los lugares dañados. Esta acumulación se utiliza a menudo como indicador del nivel del daño del ADN presente en la célula. Además la H2A.X es responsable de reclutar las proteínas de reparación del ADN, al lugar donde se ha producido el daño [28] (fig. 8).

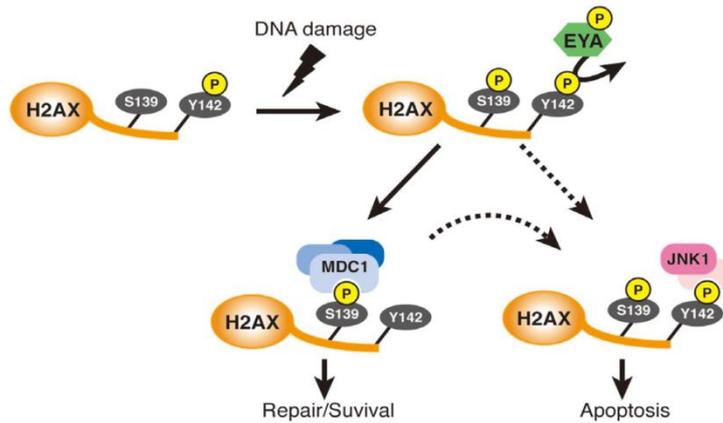


Figura 8. Ruta de señalización del ADN dañado.

Para determinar el porcentaje de histona H2A.X activada se utiliza el “ Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit”, con el que es posible monitorizar y medir con exactitud la fosforilación de la histona H2A.X en una población de células. Este kit posee dos anticuerpos directamente conjugados; uno fosfo-específico anti-fosfo-Histona H2A.X (ser139)-Alexa Fluor®555 y otro anticuerpo conjugado anti-HistonaH2A.X-PECy5 para medir los niveles totales de la histona H2A.X. Con este kit podemos determinar simultáneamente los niveles de proteína total y de proteína fosforilada.

En primer lugar las líneas celulares seleccionadas se cultivan en frascos de cultivo a 37°C, 5% de CO₂ hasta que alcanzan un 90 % de confluencia, punto en el que las células se tratan. Cada tratamiento debe de ir acompañado de un control no tratado. Las células se tratan durante 24 horas, pasadas las cuales, se centrifugan a 300 x g durante 5 minutos (Biofuge primo), eliminando el medio de cultivo. A continuación se lavan con PBS 1X y se fijan con el buffer de fijación durante 5 minutos en hielo, seguido de un lavado y se permeabilizan con buffer de permeabilización durante 5 minutos en hielo, seguido de otro lavado. En cada tubo de reacción se añaden 200000 células con 10µl de la mezcla de anticuerpos y 90µl de 1X de tampón de ensayo, la mezcla se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y las células se centrifugan a 300 x g durante 5 minutos y se lavan con tampón de ensayo 1X. Por último, se resuspenden en 200µl de tampón de ensayo 1X y se analizan las muestras en el analizador celular Muse.

4 RESULTADOS

4.1. OBJETIVO 1: Determinar si la DAO encapsulada en liposomas mantiene su actividad biológica y comparar dicha actividad con la obtenida mediante otros métodos de vehiculización de la enzima.

En estudios anteriores se determinó que, en presencia de D-alanina, tanto la DAO libre como inmovilizada en nanopartículas magnéticas, disminuían la viabilidad celular de manera significativa, observándose una disminución mayor cuando se inmoviliza la DAO en las nanopartículas magnéticas. Mediante un análisis del ciclo celular se comprobó que cada uno de estos componentes no resultaba tóxico si se aplicaba de forma independiente y mediante un ensayo de MTT se corroboró que la concentración a la cual presentan el máximo efecto cada uno de dichos componentes; esto es a 2 U/ml de DAO y 1mM de D-alanina.

Partiendo de los datos previamente conocidos, el primer paso fue determinar si era posible inmovilizar la DAO en otro vehículo, como son los liposomas y que siguiera manteniendo su actividad biológica.

Nuestros resultados indican que la DAO inmovilizada en los liposomas, pierde completamente su actividad. Realizamos una serie de comprobaciones para descartar posibles causas de esta pérdida de actividad.

En primer lugar descartamos un efecto del detergente (CHAPS) que estábamos utilizando para romper los liposomas antes de medir la actividad. Lo que hicimos fue un ensayo de medida de actividades enzimáticas; por un lado pusimos un control con la DAO libre y por otro lado diferentes alícuotas de DAO cada una de ellas con un detergente distinto para comprobar si con CHAPS o con algún otro detergente, observábamos una pérdida de actividad. Nuestros resultados indicaron que ninguno de los detergentes utilizados interfería con la actividad de DAO.

Nos planteamos la posibilidad de que durante el proceso de formación de los liposomas, alguno de los pasos realizados pudiera afectar negativamente a la actividad enzimática. Suprimimos los ciclos de congelación-descongelación y observamos que en dichas condiciones seguíamos sin observar actividad de la DAO.

Al tratarse de una enzima que presentaba su máxima estabilidad a 4°C, otra posible alternativa sería la pérdida de actividad por permanecer demasiado tiempo a temperatura ambiente durante el proceso de formación de los liposomas, por lo que construimos éstos en la cámara fría,

nuevamente sin los ciclos de congelación y descongelación. En dichas condiciones tampoco observamos actividad de la DAO.

Finalmente pensamos que podría ocurrir que el encapsulamiento de la proteína en el liposoma fuera mínimo. Para comprobar este supuesto, realizamos un ensayo de Bradford con el fin de determinar la cantidad de proteína que se encapsulaba y compararla con la cantidad que habíamos puesto inicialmente en los liposomas. Comprobamos que el 93% se encapsulaba, desechando por tanto la posible falta de encapsulamiento como causa de la pérdida de actividad enzimática.

En este punto, decidimos tratar directamente las líneas celulares y los cultivos primarios, con la DAO inmovilizada en liposomas, con el fin de comprobar si podíamos observar algún efecto aunque no fuéramos capaces de medir la actividad "in vitro".

En primer lugar lo que hicimos fue un ensayo de MTT para comprobar la concentración máxima de lípidos a partir de la cual no se producía toxicidad celular y usar la anterior a dicha concentración.

Utilizando las líneas celulares RWP-1 y HS766T en una placa de 96 pocillos probamos las siguientes condiciones: un control sin liposomas, diferentes concentraciones de lípidos y otras cinco condiciones donde añadimos las mismas cantidades que se añadieron de tratamiento y control pero de tampón (fosfato sódico 20mM pH 7.5 con 20% de glicerol (P/V)). Vimos que la que menor toxicidad generaba era 0,125mM (fig. 9).

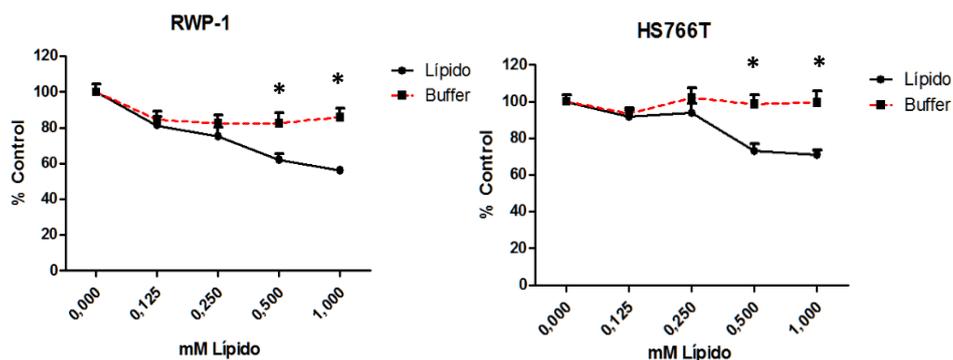


Figura 9. Toxicidad de los liposomas en los cultivos celulares RWP-1 y HS766T. Las concentraciones probadas fueron: 0,125, 0,25, 0,5 y 1mM. Los datos representan la media \pm SD, con $n \geq 3$. * $p < 0,05$.

Una vez analizados los resultados de MTT decidimos utilizar la concentración de 0,125mM para la elaboración de los liposomas. La cantidad de enzima a encapsular que utilizamos en base a la bibliografía para los liposomas de tipo LUG fue de 50 U/ml.

Antes de tratar las células con la DAO vehiculizada en los liposomas, se comprobó que la enzima no afectase al tamaño de partícula de los liposomas mediante dispersión luminosa, tal y como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los valores de polidispersidad indicaban la presencia de una única población (al ser menor de 0,2), indicando la integridad de los liposomas conteniendo a la enzima y su carácter unilamelar, por otra parte los diámetros no variaron entre los liposomas sin enzima y con enzima, indicando una alta afinidad (tabla 2).

Muestra	Diámetro (nm)	Polidispersidad
LUVs 0,125 mM	155.22	0.15
LUVs 0,125 mM	158.17	0.13
LUVs 0,125 mM	158.96	0.16
Media	157.45	0.15
Error estándar	1.14	0.01
Desviación estándar	1.97	0.02

Tabla 2. Parámetros de Polidispersidad y diámetro obtenidos por el “Low Angle Laser Light Scattering”.

Una vez determinada la concentración no tóxica de lípidos, llevamos a cabo el tratamiento sobre las líneas celulares de páncreas; RWP-1 y HS766T y sobre cultivos primarios de glioblastoma (obtenidos directamente del paciente); HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18.

La inclusión de cultivos primarios es interesante puesto que estos presentan unas condiciones más similares a las fisiológicas que las líneas celulares establecidas.

El tratamiento se realizó con la DAO libre y D-alanina, la DAO inmovilizada en nanopartículas con la D-alanina y la DAO inmovilizada en liposomas con la D-alanina. El objetivo consistía en ver las diferencias en la muerte celular con el uso de cada uno de estos tratamientos y determinar si existía un mayor aumento de muerte celular cuando la DAO era vehiculizada en los liposomas.

Tras el tratamiento determinamos la distribución en las distintas fases del ciclo celular, de las líneas celulares utilizadas en nuestro experimento, esta aproximación experimental nos permitió evaluar si los efectos observados eran citotóxicos, citostáticos, o una combinación de ambos.

En los resultados (fig. 10) se puede apreciar que en la línea celular de páncreas RWP-1 cuando se trata con la DAO y su sustrato, el pico de sub-G1, es decir, el número de células muertas, aumenta, este aumento es aún mayor cuando la enzima se inmoviliza en las nanopartículas

magnéticas, ya que como vemos hay muchas más células en la fase sub-G1 y si nos fijamos en el efecto de la DAO inmovilizada en los liposomas la muerte celular producida es mínima, de modo que se demuestra que efectivamente una vez encapsulada esta en los liposomas pierde completamente su actividad. El efecto que presenta la DAO libre y en nanopartículas magnéticas sobre esta línea celular es claramente un efecto citotóxico. En las líneas HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18 el efecto es citostático, ya que no hay tanta acumulación en la fase sub-G1, y por el contrario la mayoría de células se encuentra en la fase G2/M, pero se sigue observando que la DAO libre y en nanopartículas magnéticas si presentan efecto de muerte celular o parada del ciclo sobre las células en cambio cuando se inmoviliza en los liposomas no existe tal efecto. Por último en las HS766-T no se observa ningún efecto en ninguno de los tratamientos, ya que según estudios anteriores estas presentan una resistencia completa frente a estos tratamientos y por tanto se utiliza como control negativo.

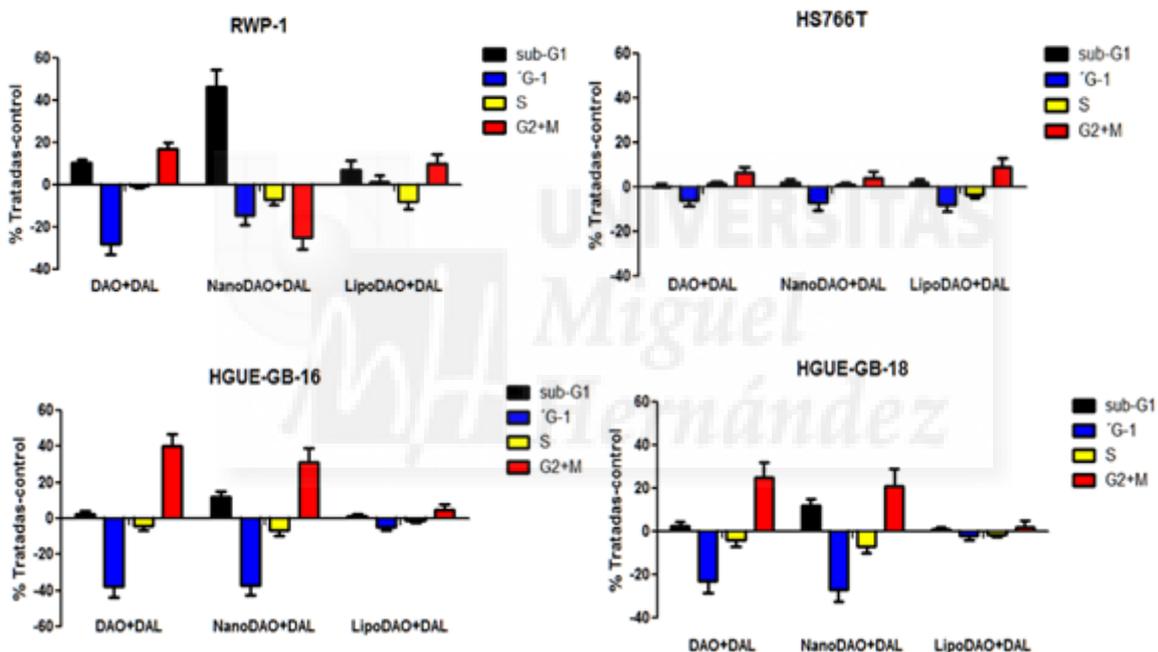


Figura 10. Estudio del ciclo celular de las líneas celulares RWP-1 y HS766T y los cultivos primarios HGUE-GB-16 y HGUE-GB-18 tratados con DAO libre, inmovilizada en nanopartículas magnéticas y en liposomas y en todos los casos activada con D-alanina. Los datos representan la media \pm SD, con $n \geq 3$.

4.2 OBJETIVO 2: Evaluar diversos tratamientos como posibles potenciadores de la DAO y la radioterapia en cultivos primarios de glioblastoma y líneas celulares de carcinoma de páncreas.

Principalmente para el estudio de la potenciación de la radioterapia y de la DAO se han utilizado cultivos primarios (extraídos directamente del paciente) ya que se asemejan en mayor medida al comportamiento fisiológico real, que las líneas celulares establecidas.

La radioterapia, favorece la generación de ROS, que provocan daños principalmente en el ADN [16]. Nos planteamos evaluar si el efecto de la radioterapia podría verse potenciado por la acción combinada con el uso de nanopartículas de oro, así como determinar posibles efectos potenciaciones de la DAO con la radioterapia y los inhibidores de PARP.

4.2.1. Evaluar la enzima D-aminoácido oxidasa como posible potenciadora de la radioterapia, por la generación de ROS.

Con el fin de comprobar si el efecto de la DAO se veía potenciado por la generación de especies reactivas del oxígeno por parte del tratamiento radioterápico, medimos la producción de radicales en aquellas células que habían sido tratadas con DAO, las que habían sido irradiadas y las que habían recibido ambos tratamientos.

El ensayo se llevó a cabo en placas de seis pocillos por triplicado utilizando el cultivo primario de glioblastoma HGUE-GB-18. Se trató con DAO más D-alanina, con 15 Gy de radiación y combinando ambas tratamientos. Una vez realizado el tratamiento y añadida la sonda, la medición de los radicales libres producidos se realizó pasadas 1 y 2 horas (fig. 11).

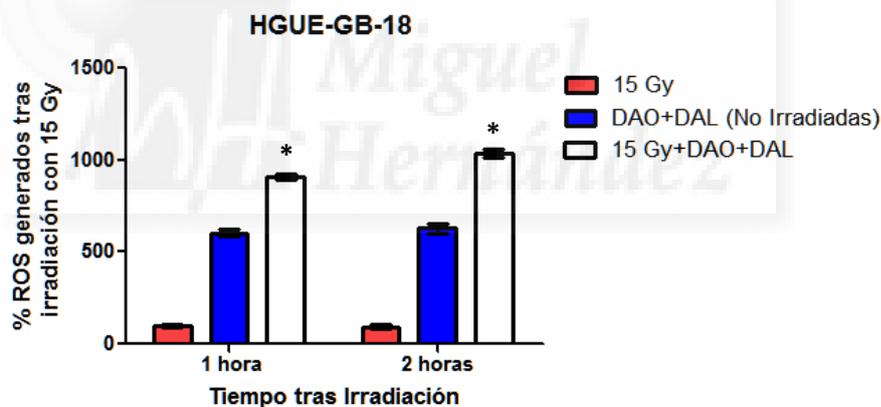


Figura 11. Porcentaje de ROS generadas tras la irradiación con 15 Gy combinada con el tratamiento de la DAO más D-alanina. Los datos representan la media \pm SD, con $n \geq 3$. * $p < 0,05$.

Nuestros resultados indican que se produce una potenciación al combinar la radioterapia y el uso de la DAO con su sustrato. Además, vemos que el efecto de la enzima es mayor que el producido por si solo con la radioterapia.

Realizamos otro ensayo para comprobar el efecto de dicha potenciación sobre el ciclo celular, utilizando los cultivos primarios de glioblastoma HGUE-GB-16, HGUE-GB-17 y HGUE-GB-18, las cuales se trataron con DAO libre más D-alanina, radiación a 7Gy y radiación a 7Gy más DAO tanto libre como en nanopartículas magnéticas y D-alanina (fig. 12).

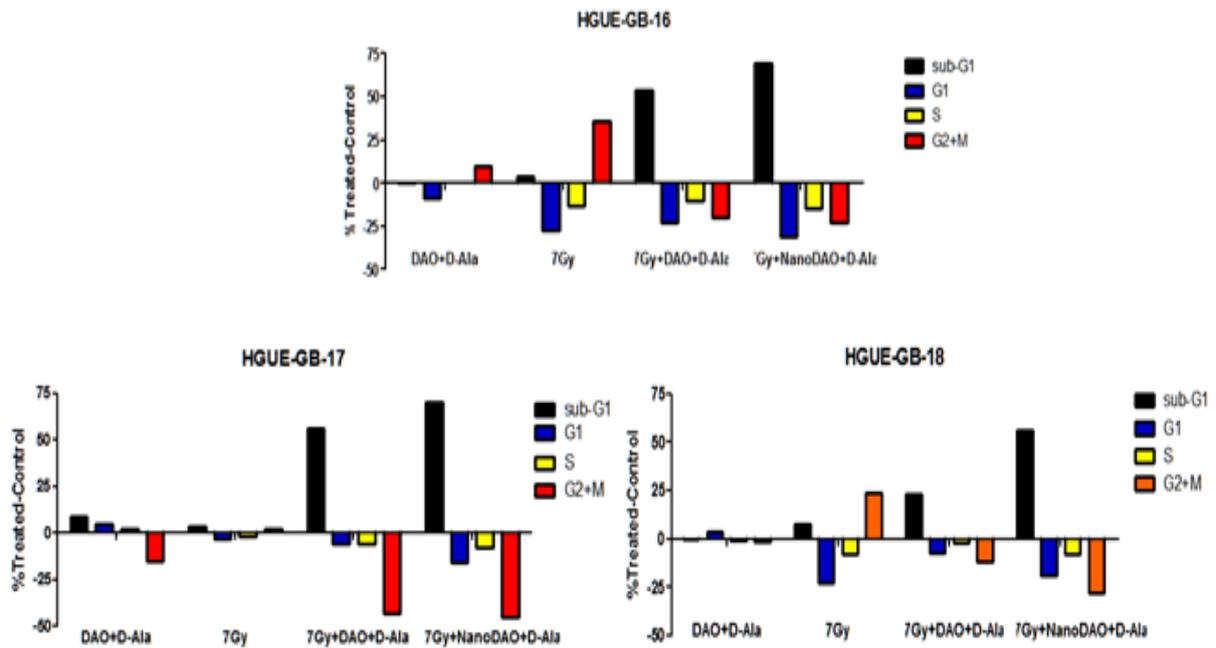


Figura 12. Experimento representativo del efecto de la potenciación en el ciclo celular en tres cultivos primarios de glioblastoma. Los tratamientos ensayados fueron DAO más D-alanina, radiación (7Gy) más DAO (libre o en nanopartículas) y D-alanina. El ensayo de citometría se realizó 24 horas después de la radiación.

Efectivamente en todos los cultivos primarios se observa que al tratar con la DAO libre más radiación a 7 Gy, hay un incremento mayor de células muertas (por un aumento en la fase sub-G1) que al aplicar cada tratamiento por separado, observándose un incremento aún mayor cuando la DAO está inmovilizada en las nanopartículas magnéticas y combinado con la radiación a 7Gy.

Otra forma de evaluar dicha potenciación es midiendo el porcentaje de Histona H2A.X activada, ya que es un indicativo de que se está produciendo daño en el ADN. Para dicha evaluación se utilizó el cultivo primario de glioblastoma HGUE-GB-18, del que se sembraron tres placas de cultivo de 6 pocillos. Los tratamientos ensayados fueron; un control (solo medio celular sin irradiar), DAO libre, DAO con D-alanina, irradiar a 15 Gy y combinar la radiación a 15 Gy con la DAO más D-alanina (fig. 13). Las medidas se realizaron utilizando el kit " Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit", y el analizador celular del Muse.

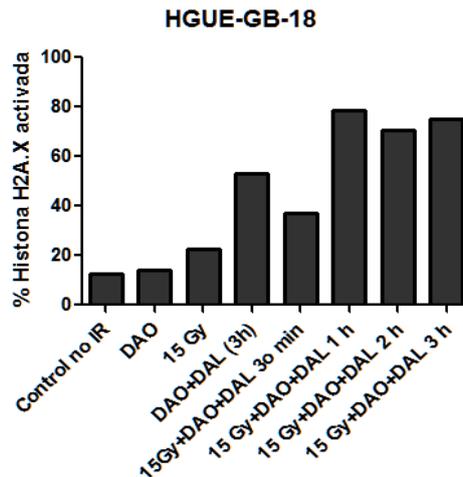


Figura 13. Porcentaje de Histona H2A.X activada generada tras aplicar tratamientos radioterápicos y la enzima DAO con su sustrato. Estudio representativo, con n=1.

Nuestros resultados indican que la radioterapia potencia el efecto de la DAO produciendo mayor daño en el ADN que cuando se aplica cada tratamiento por separado.

4.2.2. Determinar la posible potenciación de la radioterapia con nanopartículas de oro sobre cultivos primarios de glioblastoma.

Las nanopartículas de oro en combinación con la radioterapia pueden inducir un amplio rango de respuestas específicas celulares que generan daños en el ADN, entre otras cosas debido a la producción de especies reactivas del oxígeno, derivando todo ello en una disminución sobre la proliferación celular [17].

En primer lugar se llevó a cabo un ensayo de MTT para comprobar que las nanopartículas de oro por sí solas no eran tóxicas para las células.

Para ello en placas de cultivos de 96 pocillos, se sembraron las células correspondientes a las líneas celulares M220, RWP-1 y HS766T, cada línea celular fue tratada con seis condiciones distintas, (distintas concentraciones de oro por 300µl de PBS 1X) cada una de las cuales se aplicó por sextuplicado.

Nuestros resultados indican que las nanopartículas de oro no resultan tóxicas para las células, independientemente de las concentraciones utilizadas (fig. 14).

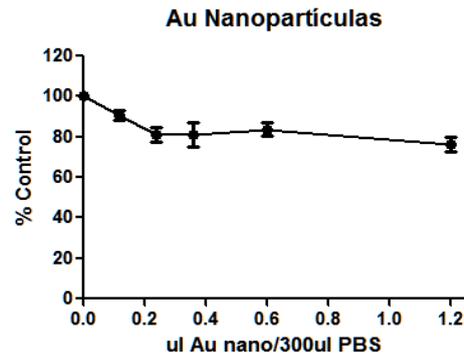


Figura 14. Comprobación de la ausencia de toxicidad celular generada en las células al tratar exclusivamente con las nanopartículas de oro. Los datos representan la media \pm SD, con $n \geq 3$.

Una vez comprobada la ausencia de toxicidad, llevamos a cabo el tratamiento con nanopartículas de oro seguido de la radioterapia, en el cultivo primario de glioblastoma HGUE-GB-16.

Cultivamos las HGUE-GB-16 en tres placas de 6 pocillos. Una de las placas era el control que no se irradió pero se dejó fuera de la estufa para que estuviera en las mismas condiciones que las otras dos placas. Otra placa fue irradiada a 15 Gy y se trató con nanopartículas de oro y sin ellas que servirían de control y la tercera era igual que la anterior la única diferencia es que, tras irradiarlas, una se dejó 24 horas y la otra 6 días.

Analizando los resultados mediante ciclo celular se comprobó que al tratar conjuntamente las nanopartículas de oro con la radiación a 15 Gy, tanto a los 24 horas como a los 6 días, hay un incremento significativo en el número de células muertas, con respecto a aquellas células que solo han sido irradiadas (fig. 15).

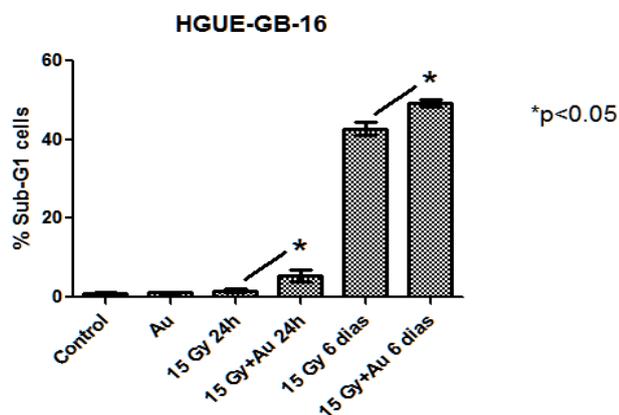


Figura 15. Porcentaje de células en la fase sub-G1 aplicando tratamientos radioterápicos combinados con el uso de nanopartículas de oro. Los datos representan la media \pm SD, con $n \geq 3$.

Decidimos comprobar si los resultados obtenidos en el cultivo primario HGUE-GB-16 se podían extrapolar a las líneas celulares T98 y U87, incluyendo la dosis 7Gy además de la de 15Gy.

Con cada línea celular se prepararon tres placas de seis pocillos; una el control que no se irradió y en la cual la mitad se trató con nanopartículas de oro y la otra mitad sin nada, otra igual pero irradiada a 7 Gy y la tercera igual pero irradiada a 15 Gy.

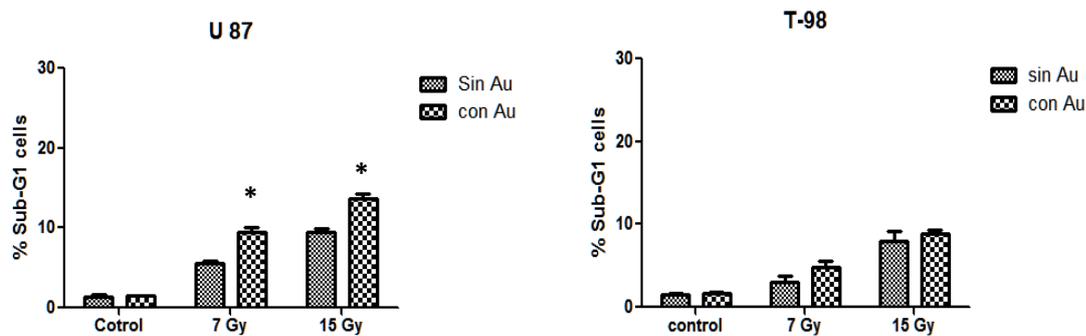


Figura 16. Porcentaje de células en la fase Sub-G1 determinadas mediante ciclo celular, en células de glioblastoma multiforme. Los datos representan la media \pm SD, con $n \geq 3$. * $p < 0,05$.

En las células U87 (fig. 16) se puede observar un aumento significativo de muerte celular cuando las células son irradiadas tanto a 7 Gy como a 15 Gy en presencia de las nanopartículas de oro. Esta potenciación no es tan clara en las T98, produciéndose una muerte mucho menor.

4.3. OBJETIVO 3. Evaluar si los inhibidores de PARP pueden también potenciar el efecto generado por la DAO.

Sabemos que durante la reacción catalizada por la DAO se produce H_2O_2 , que posteriormente dará lugar a la formación de radicales libres, los cuales son, en principio, los que causan la muerte celular. Nuestro objetivo es encontrar algún tratamiento que potencie esta muerte celular. Decidimos utilizar un inhibidor de PARP, el Eb47 (CALBIOCHEM®), este se trata de un potente inhibidor soluble de PARP-1 que muestra efectos citoprotectores frente al daño oxidativo en las células.

Utilizando las líneas celulares de carcinoma de páncreas HS766T, RWP-1 y M220, se llevaron a cabo los siguientes tratamientos en placas de cultivo individuales; un control únicamente con medio, DAO más D-alanina, el inhibidor Eb47 y DAO más D-alanina más el inhibidor Eb47.

Mediante citometría de flujo, se determinó la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (fig. 17). A cada uno de los tratamientos se le restó su control.

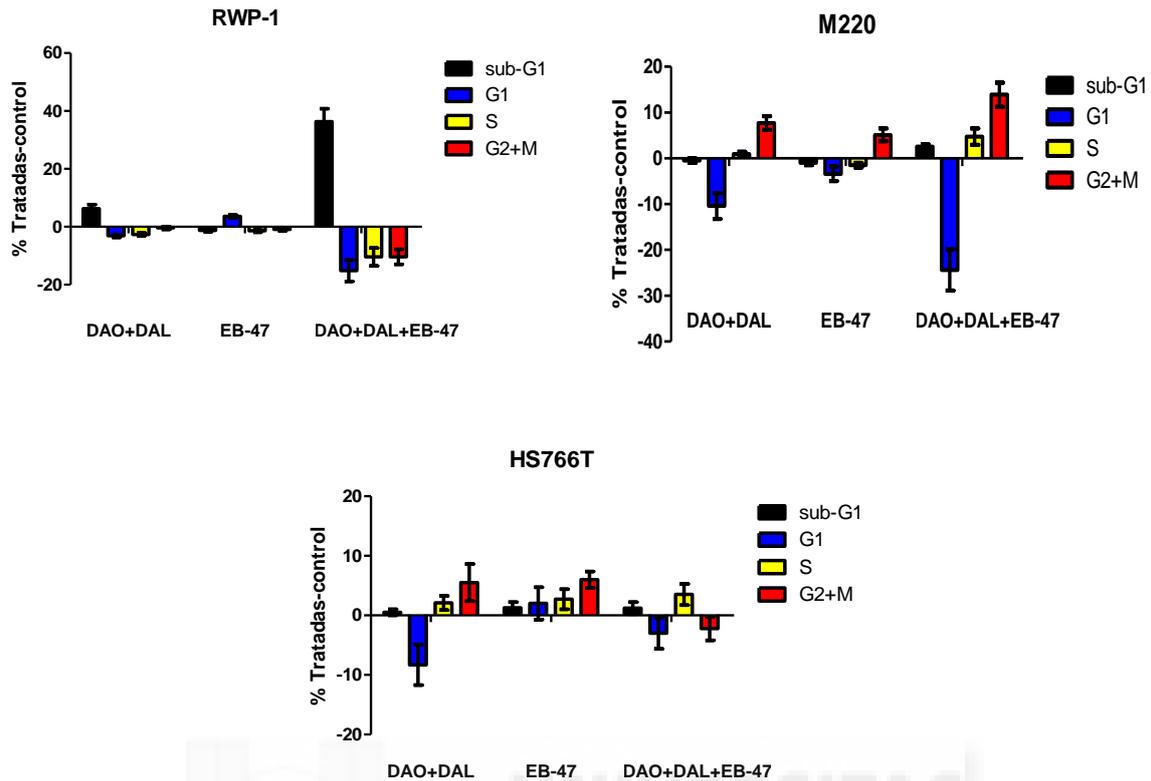


Figura 17 . Efecto conjunto del inhibidor de PARP EB-47 a una concentración de 10 μ M, con la DAO y su sustrato sobre diferentes líneas celulares de carcinoma de páncreas. Los datos representan la media \pm SD, con $n \geq 3$.

En la línea celular RWP-1 al aplicar por separado cada tratamiento no se observan niveles elevados de muerte celular, sin embargo, si se ve una clara potenciación de la muerte celular (ya que hay una gran cantidad de células en la fase sub-G1) cuando se trata conjuntamente con la DAO y el inhibidor EB-47. Por lo que la combinación de ambas cosas presenta un efecto citotóxico mayor sobre las células. En las M220 se observa que en el tratamiento conjunto hay pocas células muertas, sin embargo, éstas se encuentran principalmente en G2-M, por lo tanto en este caso se ve un efecto citostático ligeramente potenciado. Por último, en las HS766T no se observa ninguna potenciación, ya que presentan una resistencia total al tratamiento de la DAO y por tanto se utilizan como control.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo se ha centrado en corroborar los resultados preliminares a cerca de la enzima D-aminoácido oxidasa de *R. gracilis* como posible terapia enzimática frente al cáncer mediante la producción de radicales libres causada por la catálisis enzimática de su sustrato, un D-aminoácido, que en nuestro caso es la D-alanina y posteriormente en la búsqueda de un sistema de vehiculización alternativo a las nanopartículas magnéticas que mejorara la estabilidad y eficacia de la enzima. El vehículo utilizado han sido los liposomas, ya que nuestro equipo poseía una experiencia previa con el uso de inmunoliposomas dirigidos [29].

El primer paso, ha sido determinar la actividad de la enzima de forma libre y compararla con la medida obtenida una vez que era vehiculizada en el liposoma. Observamos que una vez vehiculizada pierde completamente su actividad. Se han llevado a cabo un conjunto de modificaciones en el protocolo de elaboración de los liposomas para asegurar que no es debido al proceso de producción. Estas modificaciones han sido; realizar los liposomas en la cámara fría para mantener al enzima durante todo el proceso a su temperatura de máxima estabilidad, eliminar los ciclos de congelación y descongelación que podrían afectar a la estabilidad enzimática y utilizar para romper el liposoma antes de medir la actividad un detergente que no afecte a la actividad. Ninguna de estas modificaciones ha generado cambios en la actividad enzimática. Por tanto, esta pérdida de actividad podría ser debida a que la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido, o que los grupos reactivos del soporte reaccionen con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima. La inmovilización podría alternativamente originar un cambio conformacional que dé lugar a una forma inactiva. Por último, podría suceder que alguna de las condiciones experimentales del proceso cause la desnaturalización o desactivación de la enzima [30].

Tras estudiar su comportamiento “in vitro” y no observar actividad alguna, se ha decidido hacer una prueba “in vivo”, tratando directamente sobre distintos tipos celulares para determinar si aunque no hemos sido capaces de medir su actividad “in vitro”, hay algún efecto sobre estas. También se ha tratado con DAO libre e inmovilizada en nanopartículas magnéticas para poder realizar una comparativa. No se ha observado ningún efecto significativo producido por la DAO cuando está inmovilizada en los liposomas.

Como alternativa, hemos pensado en la posible potenciación de la capacidad generadora de especies reactivas del oxígeno de la DAO, puesto que estas especies reactivas desencadenan en la generación de radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN [8]. Como potenciador pensamos en la radioterapia [16], ya que con

esta también se generan radicales libre. Al utilizar ambos tratamientos conjuntamente, se ha observado que hay un claro aumento en el porcentaje de ROS tras irradiar con 15 Gy (fig. 11) lo que correlaciona con los resultados obtenidos en el ciclo celular (fig. 12) que muestran un aumento en el porcentaje de células muertas, al combinarlo con irradiación, en este caso a 7 Gy.

Además de determinar la cantidad de ROS generadas cuando se utilizan ambos tratamientos conjuntamente, se ha analizado el porcentaje de histona H2A.X activada, ya que es un importante indicador del daño en el ADN y se ha observado que los niveles son mucho mayores que cuando se trata por separado y además los niveles máximos de activación se alcanzan tras la primera hora de tratamiento (fig. 13).

Por otra parte, según la literatura anterior [17], el efecto de la radioterapia también se podía potenciar mediante el uso de nanopartículas de oro, de modo que se ha probado cada tratamiento por separado y en conjunto sobre células de glioblastoma multiforme (fig.16) y cultivos primarios de glioblastoma (fig. 15). Un vez analizados mediante ciclo celular, se ha observado un efecto claro de potenciación ya que cuando se trata conjuntamente se observa un aumento del porcentaje de células muertas en la fase sub-G1.

Por otro lado , hemos probado la potenciación de la DAO con otros tratamientos que no generan ROS, como son inhibidores de PARP, en concreto el EB-47. Estos inhibidores inhiben la actividad enzimática responsable de reparar el daño que se genera en el ADN. Se han analizado los resultados mediante ciclo celular y se ha observado que en ciertas líneas celulares de páncreas (RWP-1), hay una potenciación significativa de la muerte celular al tratar conjuntamente con ambos tratamientos, ya que se ve un aumento de células en fase sub-G1, observándose un claro efecto citotóxico, mientras que en otra de las líneas (M220) se observa también potenciación pero el efecto es más bien citostático. Las HS766T sin embargo son resistentes a cualquier tratamiento (fig. 17).

Por todos los datos expuestos en esta memoria, pensamos que aunque no es factible utilizar la DAO inmovilizada en liposomas como terapia enzimática contra el cáncer, sí que se puede utilizar conjuntamente la DAO con otros tratamientos que potencien su efecto, como son la radioterapia, las nanopartículas de oro y los inhibidores de PARP.

6 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

A lo largo del trabajo se han corroborado los efectos producidos por la DAO sobre diferentes líneas tumorales, así como su estabilidad al ser inmovilizada en diferentes soportes, principalmente en liposomas, su posible potenciación por la acción combinada con otros tratamientos; radioterapia e inhibidores de PARP y finalmente la potenciación por la acción combinada de la radioterapia con nanopartículas de oro. Las conclusiones que podemos extraer son:

1. Al añadir DAO libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas junto con D-alanina se produce una disminución de la proliferación y/o viabilidad celular, obteniendo un efecto máximo con 2U/ml de DAO y 1mM de D-alanina. Se ha observado que la DAO es efectiva sobre diferentes líneas tumorales de páncreas y glioblastoma.
2. La DAO pierde su actividad completamente cuando se vehiculiza en los liposomas, y por lo tanto no se han observado los efectos deseados cuando se han tratado las diferentes líneas celulares y cultivos primarios.
3. Al combinar la DAO libre con la radioterapia se observe un incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno que cuando interactúan con la materia y ceden la energía, producen roturas en enlaces de moléculas biológicas, encontrándose entre las más susceptibles el ADN, y por tanto generando la muerte celular.
4. La combinación de la DAO libre con el inhibidor de PARP EB-47 presenta un efecto claramente potenciado de muerte celular. En algunas líneas celulares de páncreas se observa un efecto citotóxico, por el incremento en el número de células muertas, al acumularse en fase sub-G1 y en otras se muestra una parada del ciclo celular en G2/M seguido de muerte celular y por tanto un efecto citostático.
5. Se ha observado una potenciación de los efectos de la radioterapia con el uso combinado de nanopartículas de oro. Al medir el porcentaje de células que se encuentran en la fase sub-G1 del ciclo celular, este es mucho mayor y difiere significativamente del número de células muertas que se obtienen al tratar con cada condición por separado.

A pesar de que a lo largo del estudio se ha podido demostrar el efecto de la enzima libre y potenciada con otros tratamientos como son inhibidores de PARP y radioterapia, tanto a nivel de proliferación como de ciclo celular en varias líneas celulares, la potencialidad de este sistema debe ser verificada con estudios más amplios de distribución en tejidos, citotoxicidad, etc. Este estudio debe ampliarse también a un mayor número de líneas celulares y a otros tipos de cáncer, así como también ajustando las dosis adecuadas, con el objetivo final de darle validez al sistema propuesto en este trabajo y su posible utilización como terapia enzimática contra el cáncer.

Además, en este estudio se han probado por un lado la potenciación de la DAO con la radioterapia y por otro lado la potenciación de la radioterapia con nanopartículas de oro, de modo que como ambos sistemas han dado resultado, en futuros experimentos se comprobará si inmovilizando la DAO en estas nanopartículas de oro y combinándolo con la radioterapia se observa un incremento aún mayor de ROS y por consiguiente de muerte celular. También se deben ajustar tanto las dosis de nanopartículas de oro a añadir como el tamaño adecuado de estas y probar en más líneas celulares para corroborar que se da en todas ellas dicha potenciación.

Debido a que los liposomas no parecen ser el mejor sistema de vehiculización para la DAO, se buscarán otro tipos de soportes como dendrímeros, con el objetivo de ver cuál es más idóneo para esta enzima, o lo que es lo mismo, en cuál de ellos se observa una mayor eficacia y estabilidad para su futuro uso como terapia enzimática. No obstante, el grupo también está pensando en dirigir la enzima mediante otros sistemas, como podría ser el uso de anticuerpos bioconjugados a las nanopartículas, visto que este sistema si resulta ser muy efectivo.

Debido a la inestabilidad del enzima cuando es expuesta a una temperatura por encima de los 4°C o muy por debajo de ésta, sería interesante realizar experimentos de evolución dirigida para establecer mutaciones en la enzima para encontrar una que a 37°C no perdiese su actividad tan rápido, de esta forma podría volverse a intentar su encapsulamiento en los liposomas y ver si se observa actividad.

Dado que con el inhibidor de PARP EB-47 se observa una mayor muerte celular, sería interesante probar con distintos inhibidores de PARP para comprobar si el efecto es general a todos ellos y si es mayor en uno que en otros y ajustar las dosis adecuadas para obtener el mayor efecto posible, así como combinar a su vez estos inhibidores con la DAO y los tratamientos radioterápicos para ver si la potenciación es aún mayor. Por último realizar los tratamiento en más líneas celulares para comprobar que dicha potenciación se observa en todas ellas.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. "Defining Cancer". National Cancer Institute. Retrieved 10 June 2014.
2. Firman G (2010) "Principios de tratamiento oncológico".
3. Fang J, Nakamura H, Iyer AK (2007) Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* 15, 475–486.
4. Niculescu-Duvaz I & Springer CJ (2005) Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol* 30, 71–88.
5. "Targeted Cancer Therapies". National Cancer Institute. Retrieved 25 April 2014.
6. Davies KJ (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61, 1–31.
7. Schüth, F., Lu, A.H, Salabas, E.L. (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl*. 46, p. 1222-1244.
8. Michael Schieber and Navdeep S. Chandel (2014 May 19) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*. 24(10): R453–R462.
9. Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB & Kola I (1997) Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ* 8, 589–598.
10. Matura T, Kai M, Fujii Y, Ito H & Yamada K (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free Radic Res* 30, 73–83.
11. Guisán, J.M. (2006) Immobilization of enzymes as the 21st century begins: An already solved problem or still an exciting challenge? In: *Methods in Biotechnology 22: Immobilization of Enzymes and Cells* (2nd Edition), ISBN: 978-1-58829-290-2, Edited by: J.M. Guisán, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, p. 1-15.
12. Arroyo M (1998) Inmovilización de enzimas. *Fundamentos, métodos y aplicaciones*. *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23-39.
13. Ansari, S.A., Husain, Q. (2012) Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnol Adv*. 30, p. 512-523.
14. González Pérez M (2004) Los liposomas: Usos y perspectivas. *Revista Cubana de química*, Vol. XVI, Nº 1.
15. Sabín Fernández JD (2007) Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. Tesis doctoral, Facultad de Física, Universidad de Santiago de Compostela, España.
16. Núñez M. (2008) Efectos biológicos de las radiaciones- dosimetría. Escuela Universitaria de Tecnología Médica UdelaR, Montevideo, Uruguay Comité de Tecnólogos de ALASBIMN.
17. B. Jeremic, A. R. Aguerri, N. Filipovic (2013) Radiosensitization by gold nanoparticles. *Clin transl Onco* 15:593-601.
18. Yelamos J. (2014) Poli (ADP-ribosa) polimerasas. Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques.

19. Ben-Yoseph O & Ross BD (1994) Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment. *Br J Cancer* 70, 1131–1135.
20. Stegman LD, Zheng H, Neal ER, Ben-Yoseph O, Pollegioni L, Pilone M & Ross BD (1998) Induction of cytotoxic oxidative stress by d-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* d-amino acid oxidase: a cancer gene therapy strategy. *Hum Gene Ther* 9, 185–193.
21. Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS & Molla G (2007) Physiological functions of d-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci* 64, 1373–1394.
22. Pollegioni L, Sacchi S, Caldinelli L, Boselli A, Pilone MS, Piubelli L & Molla G (2007) Engineering the properties of d-amino acid oxidases by a rational and a directed evolution approach. *Curr Protein Pept Sci* 8, 600–618.
23. Yoshikawa T, Kokura S, Tainaka K, Naito Y & Kondo M (1995) A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res* 55, 1617–1620.
24. Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., García, E. (1992) Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur J Biochem* 203, p. 153-159.
25. Moldes, C. (2003) Desarrollo de nuevos sistemas para la producción de proteínas de fusión por fermentación. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.
26. Ruano Aldea M (2013) Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, España.
27. Tomás Menor L (2015) . Caracterización analítica y funcional de extractos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas del género *Cistus*. Tesis Doctoral, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández de Elche, España.
28. Sharma A, Singh K, Almasan A (2012) Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. *Methods in Molecular Biology* Volume 920, 2012, pp 613-626.
29. Barrajón-Catalán E, Menéndez-Gutiérrez MP, Falco A, Carrato A, Saceda M, Micol V (2009) Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: Correlation with their HER2 expression level. *Cancer Lett.* 290(2):192-203.
30. Alfaro Ureña Y.(2012) Nueva nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa de *Desulfotalea psychrophila*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, España.