

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Evaluación de la D-Aminoácido oxidasa como posible
terapia antitumoral en diferentes tipos de neoplasias.**

Elizabeth Pérez Valenciano

Grado en Biotecnología, 2016-2017

Facultad de Ciencias Experimentales

Tutores

Miguel Saceda Sánchez y Víctor Manuel Barberá Juan

Área de Bioquímica y Biología Molecular

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Cuantificación de la DAO	13
3.2. Ensayo de actividad de la DAO	13
3.3. Líneas celulares	13
3.4. Muestras biológicas	14
3.5. Preparación de las placas para realizar los experimentos	14
3.6. Tratamientos	14
3.7. Ciclo celular	15
3.8. Ensayo de conteo y viabilidad celular	16
3.9. Kit de detección de citotoxicidad (LDH)	17
3.10. Evaluación de la permeabilidad de la membrana	18
3.11. Conteo celular y evaluación de viabilidad por el método Trypan Blue	18
3.12. Análisis estadístico	18
4. RESULTADOS	19
4.1. OBJETIVO 1: Realizar un cribado de líneas celulares tumorales de diverso origen para determinar si el efecto de la DAO en colon es extrapolable a otros tipos de cáncer	19
4.2. OBJETIVO 2: Determinar si el tratamiento con la DAO produce muerte celular sobre diferentes líneas celulares no tumorales	22
4.3. OBJETIVO 3: Determinar si el mecanismo de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO en carcinoma de colon y páncreas es similar al mecanismo de acción de la DAO en glioblastoma	24
4.4. OBJETIVO 4: Determinar si existe un efecto diferencial de inducción de muerte celular por la DAO en cultivos primarios de linfocitos aislados de muestras de sangre periférica de pacientes del Hospital General Universitario de Elche (HGUE) no oncológicos o pacientes con leucemia aguda	26
4.5. OBJETIVO 5: Determinar si las vías de transducción de señales mediadas por las PKCs clásicas y la vía de NFK β pueden modular los efectos de la DAO en células hematopoyéticas	29
5. DISCUSIÓN	32
6. CONCLUSIONES	35
7. BIBLIOGRAFÍA	37

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

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

DAG: 1,2-diacilglicerol

D-Ala: D-Alanina

DAO: D-Aminoácido Oxidasa

DEAE: Dietilaminoetanol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ϵ : Coeficiente de extinción molar

FAD: Dinucleótido de Adenina-Flavina

HGUE: Hospital General Universitario de Elche

IBMC: Instituto de Biología Molecular y Celular

IC: Inhibidor de Caspasas

I κ B: Inhibidores de κ B

INT: 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB: Luria-Bertani

LDH: Lactato Deshidrogenasa

LMA 0: Leucemia Mieloide Aguda sin diferenciación localizada

LMA 1: Leucemia Mieloide Aguda sin maduración

LMA 2: Leucemia Mieloide Aguda con maduración

LLA: Leucemia Linfoide Aguda

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

NAD: Dinucleótido de Adenina-Nicotinamida

NC: Necrostatina

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

PBS: Tampón fosfato salino

PKC: Proteína Quinasa C

RIP1: Receptor-Interacting Protein Kinase 1

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SBF: Suero fetal bovino

SD: Desviación estándar

SOD: Superóxido dismutasa

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

TPA: 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato

TSA: Tricostatina A

TNRF: Receptor del factor de necrosis tumoral

RESUMEN

La D-aminoácido oxidasa (DAO) cataliza la desaminación oxidativa de D-aminoácidos, generando α -cetoácidos, amonio y H_2O_2 . Interesa como terapia contra el cáncer ya que los sustratos no son endógenos del organismo, por lo que es posible regular su actividad al alcanzar el tumor. El H_2O_2 atraviesa la membrana celular y genera estrés oxidativo afectando a la supervivencia celular.

Se ha estudiado el efecto de la DAO con la D-Alanina en líneas celulares tumorales, observando muerte celular en algunos casos y en otros un mecanismo citostático con bloqueo en la fase G_2/M , y en células no tumorales probando su selectividad hacia las células tumorales. También se investigó el mecanismo de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO en células de glioblastoma llegando a la conclusión de que se trata de una apoptosis clásica.

Finalmente se comenzó un estudio piloto con el HGUE para analizar el efecto de la enzima sobre cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica de pacientes con leucemia y de pacientes no oncológicos ni infecciosos. Se observó una disminución selectiva de blastos en algunos tipos de leucemia y se iniciaron estudios sobre la participación de las PKC clásicas y el NF- κ B en la sensibilidad y/o resistencia de las células a la DAO.

Palabras clave: Terapia enzimática, D-aminoácido oxidasa, estrés oxidativo, muerte celular

SUMMARY

D-Amino acid oxidase (DAO) catalyzes the oxidative deamination of D-amino acids, giving rise to α -keto acids, ammonia and H_2O_2 . It interests as therapy against cancer because the D-amino acids are not endogenous in the organism so it is possible to regulate its activity in the tumor. The H_2O_2 traverses the cell membrane and generates oxidative stress affecting cell survival.

We studied the effect of the enzyme DAO with D-Alanine on tumor cell lines, getting cell death in some cases and, in others, a cytostatic mechanism with blockage in the phase G_2/M , and on non-tumor cells proving her selectivity to tumor cells. The mechanism of induction of cell death carried out by DAO was also researched in glioblastoma cells concluding that it is a classic apoptosis.

Finally, we started a pilot study with the HGUE to analyze the effect of the enzyme on primary cultures of peripheral blood lymphocytes from patients with leukemia and from non-oncological and non-infectious patients. A selective decrease of blasts was observed in some types of leukemia and we started studies about the participation of classical PKC and NF- κ B in the sensitivity and / or resistance of cells to the enzyme DAO.

Keywords: Enzyme therapy, D-amino acid oxidase, oxidative stress, cell death

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que se pierde el control de la división celular y las células afectadas son capaces de invadir y colonizar otros tejidos. En condiciones normales, las células crecen y se dividen de forma controlada para producir nuevas células según las necesidades del organismo y después de un número determinado de divisiones, o si resultan dañadas, entran en senescencia o mueren. Sin embargo, en ocasiones el material genético puede sufrir cambios o mutaciones que afectan al control del crecimiento y a la división celular, de forma que las células dañadas no mueren y se generan nuevas células cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y finalmente dar lugar a un tumor (Fig. 1). [1]

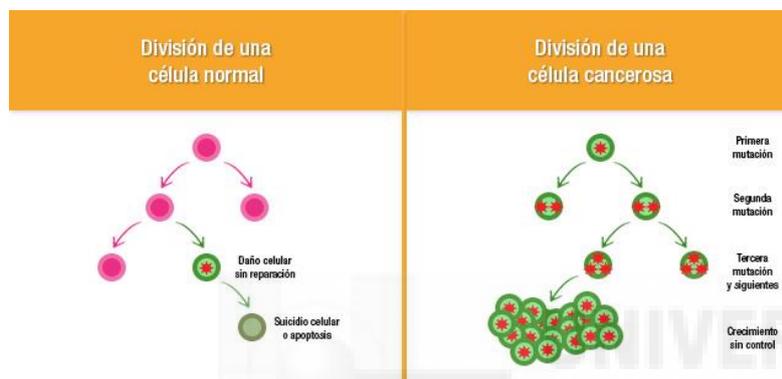


Figura 1. División celular normal frente a la división celular producida en procesos tumorales.

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchos aspectos que les permiten crecer sin control y se vuelven invasivas. Una diferencia importante es que las células cancerosas no se diferencian terminalmente y mantienen la capacidad de dividirse sin control. Además, las células cancerosas pueden ignorar las señales de apoptosis y evadir el sistema inmunitario, incluso pueden utilizar al sistema inmune para protegerse. Por último, también tienen la capacidad de influir en las células normales, por ejemplo induciendo la angiogénesis por su acción sobre las células endoteliales, lo que les permite generar nuevos vasos sanguíneos que alimentan las células del tumor, suministran oxígeno y nutrientes necesarios para la supervivencia de las células que forman el tumor y retiran los productos de desecho de dichas células. [2]

Cuando las células crecen sin control, en la mayoría de casos se desencadena el fenómeno de la metástasis, las células se separan del tejido donde inicialmente se formaron, invadiendo los tejidos circundantes hasta alcanzar y penetrar en el sistema sanguíneo y/o linfático donde inician su migración hacia otras partes del cuerpo donde formarán nuevos tumores (Fig.2).

Según los datos presentados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), el número de nuevos casos diagnosticados de cáncer en España superó ya en 2015 el inicialmente previsto para el año 2020. El número total de nuevos casos de cáncer en España en 2015 fueron de 247.771 (148.827 varones y 98.944 mujeres), siendo el tipo más frecuente el cáncer colorrectal, por delante del cáncer de próstata, pulmón, mama y vejiga [3].

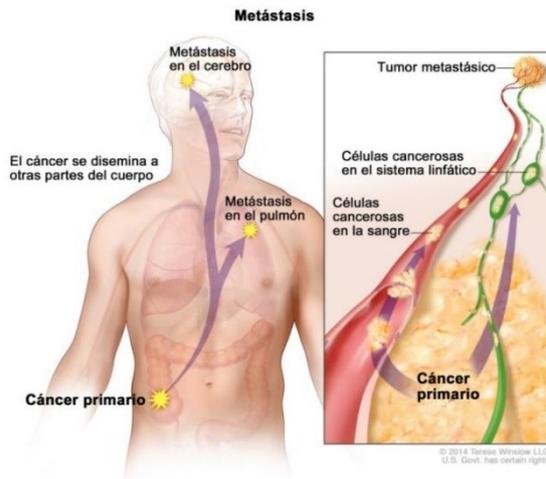


Figura 2. Proceso de metástasis.

Por otra parte, existen también tumores hematológicos que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades originadas a partir de las células de la médula ósea y del sistema linfático. La clasificación de estas neoplasias se basa en una combinación de características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas, dividiéndolas en leucemia, linfoma y neoplasia de células plasmáticas [4][5]. La leucemia según su origen se divide en mieloide o linfoide (Fig.3), y a su vez, según la presentación de la enfermedad se clasifica en aguda o crónica.

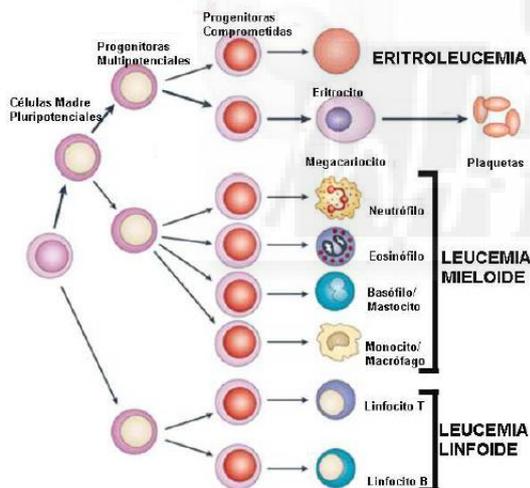


Figura 3. Clasificación de las leucemias según las células progenitoras de las que derive.

En dos de los objetivos de este trabajo vamos a centrarnos en las leucemias agudas:

- La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) representa un grupo de desórdenes hematopoyéticos en los cuales se produce un fallo en el control de la diferenciación y proliferación de los precursores mieloides, induciendo una acumulación de células no funcionales llamadas mieloblastos [6]. Debido a este fallo en la médula ósea, los pacientes con esta enfermedad sufren de neutropenia, anemia y trombocitopenia, manifestándose en fatiga, hemorragias o producción de hematomas, fiebre e infecciones [7][8].

Constituye el 30% de las leucemias en adultos y el 0,6% de todos los cánceres [4].

- La Leucemia Linfoide Aguda (LLA) es un grupo heterogéneo de desórdenes linfoides como resultado de una proliferación y expansión monoclonal incontrolada de células linfoides inmaduras en la médula ósea, sangre y

otros órganos [9]. Los síntomas de la enfermedad son debidos a la expansión de las células leucémicas en la médula ósea, sangre periférica y zonas extramedulares. Estos síntomas son fatiga, falta de energía, disnea, mareo, hemorragia, hematomas e infecciones. El examen físico revela palidez, equimosis o petequias [10]. La linfadenopatía y hepatoesplenomegalia son síntomas raros, que se observan en un 20% de pacientes [9]. La afectación del sistema nervioso central es también poco común observándose en el 5-8% de los pacientes [11]. Constituye el 15% de las leucemias en adultos, pero en pacientes menores de 20 años constituye el 80% de las leucemias agudas y el 30% de todos los cánceres [4].

Terapias alternativas frente al cáncer

En la actualidad, los tratamientos anticancerígenos convencionales son la radioterapia, la quimioterapia y la cirugía [12]. Sin embargo, la selectividad de la mayoría de fármacos hacia las células tumorales es demasiado baja, asociándose con importantes efectos secundarios, ya que las células no tumorales más afectadas por el efecto citotóxico de dichas terapias son aquellas que comparten características con las células tumorales, especialmente la multiplicación celular a gran velocidad, como son las de los folículos pilosos, médula ósea, el tubo digestivo y el sistema reproductor. Por otro lado, en la mayoría de los casos resulta difícil la eliminación completa del tumor, apareciendo células resistentes y otro problema adicional lo constituye la accesibilidad del fármaco a los tumores sólidos, debido a la pobre vascularización y a la necrosis [13]. Por último, hay que tener en cuenta que cada tumor es único y diferente por la presencia de una variedad histológica de la población celular dentro del tumor muy grande y esto hace difícil encontrar una terapia que sirva para todos los tumores [14].

Por lo expuesto, 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 la terapia dirigida. [15] Este tipo de terapia presenta ventajas frente a las terapias convencionales, como es la actuación en blancos moleculares específicos con el objetivo de no afectar a todas las células y su capacidad de bloquear la proliferación de las células tumorales en vez de destruir células sin distinción como ocurre, por ejemplo, en la quimioterapia.

Una estrategia reciente en este campo para el tratamiento de los tumores es la terapia enzimática que consiste en dirigir una enzima exógena 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 microambiente del tumor. [14][16] Uno de los mecanismos en los que se basa este tipo de terapias es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tumores. Un aumento de ROS genera estrés oxidativo, produciendo daños en el ADN, así como oxidación de los ácidos grasos y de los aminoácidos afectando a las funciones y supervivencia celular [13][17][18].

Uno de los ROS que se generan con este tipo de terapias es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que atraviesa la membrana y produce daños por oxidación directa del ADN, de las proteínas y de los lípidos [19][20].

Muerte celular por especies reactivas de oxígeno (ROS)

Existen varios mecanismos de muerte celular que podrían estar sucediendo en las células tratadas con enzimas

generadoras de ROS. En general, la muerte celular se puede dividir en dos tipos: programada y no controlada. A continuación, únicamente se presentan los tipos de muerte celular más conocidos actualmente.

La muerte celular no controlada o necrosis es un tipo de muerte celular accidental que se produce en respuesta a daños, isquemia y otros estímulos nocivos que producen en el organismo una respuesta inflamatoria. Se caracteriza por un aumento del volumen celular, hinchazón de los orgánulos, ruptura de la membrana plasmática y, por tanto, pérdida del contenido celular. [21][22]

La muerte celular programada participa en procesos vitales para el organismo como el correcto desarrollo de los órganos, la eliminación de los linfocitos T que reconocen antígenos propios, la defensa frente a patógenos o la prevención de la aparición de tumores [23][24]. Este tipo de muerte celular se encuentra dividida en aquella que es dependiente de caspasas y la que es independiente de las mismas. Dentro de la muerte celular dependiente de la activación de las enzimas caspasas destaca la apoptosis. El término apoptosis describe un fenómeno fisiológico de muerte celular caracterizado morfológicamente por el redondeamiento de la célula, la reducción del volumen celular, mínima afectación ultraestructural de los orgánulos citoplásmicos, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación del núcleo, formación de evaginaciones en la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos (vesículas de membrana plasmática con componentes citosólicos y cromatina condensada en su interior). [21][22].

Existen otros tipos de muerte celular programada no dependientes de caspasas, en este tipo destacan la catástrofe mitótica, la autofagia y la necroptosis.

La muerte celular causada por la imposibilidad de completar el proceso de la mitosis ha sido denominada catástrofe mitótica. El principal rasgo distintivo de la catástrofe mitótica es el tamaño celular anormalmente grande y la multinucleación que refleja la segregación anormal de los cromosomas propia de mitosis aberrantes [25].

La autofagia es un proceso celular de autodigestión de orgánulos y otros componentes citosólicos como lípidos y proteínas. Este proceso se desencadena como consecuencia de diferentes tipos de estrés celular (privación de nutrientes, hipoxia, estrés oxidativo, daño en el ADN, orgánulos dañados, presencia de patógenos intracelulares, etc.) y permite a las células mantener su homeostasis energética y eliminar orgánulos dañados y componentes tóxicos. En el proceso autofágico se produce la internalización del material citoplásmico a eliminar en vacuolas (autofagosomas), las cuales se fusionan con los lisosomas y forman los denominados autolisosomas en los que tiene lugar la degradación. Este fenómeno se entiende como un mecanismo citoprotector, es decir, como una estrategia adaptativa de supervivencia celular. Sin embargo, la autofagia también ha sido relacionada con la iniciación de procesos de muerte celular programada e incluso se ha llegado a plantear que constituye un mecanismo de muerte celular por sí misma [26].

El término necroptosis ha surgido para definir un tipo de necrosis que se desarrolla bajo la regulación de rutas de transducción de señales y mecanismos catabólicos [27]. Este tipo de muerte celular presenta las características morfológicas de la necrosis, puede ser activado por los ligandos de los receptores de muerte o por daños en el

ADN [28][29], y en él desempeña un papel fundamental la serina treonina quinasa RIP1 (Receptor-Interacting Protein kinase 1) [30]. Este tipo de muerte se ha observado en respuesta a los ligandos del receptor de muerte TNFR1 y puede ser inhibida por la necrostatina-1 (NC), un inhibidor de la actividad de la quinasa RIP1 [31].

Rutas de transducción de señales

La transducción de señales es el proceso por el que una célula convierte una señal o estímulo extracelular en una señal intracelular. Esto se inicia con la unión de ligandos a receptores celulares a través de los cuales se transmite la señal al interior celular y tiene como consecuencia una respuesta (Fig.4).

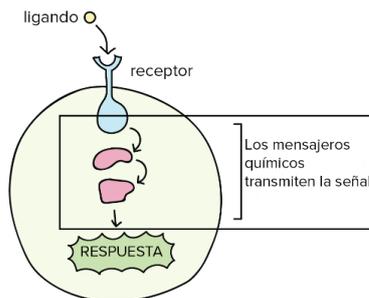


Figura 4. Transducción de señales.

La proliferación y la muerte celular son procesos celulares altamente regulados en los que intervienen vías de transducción de señales. Las células tumorales presentan, entre otras alteraciones, anomalías en moléculas que forman parte de estas vías y, como resultado, presentan una proliferación descontrolada y defectos en los mecanismos de inducción de muerte celular. Es por ello que las rutas de transducción de señales son importantes en la búsqueda de dianas moleculares para el tratamiento del cáncer y las líneas de investigación que se dedican a ello se centran en rutas relacionadas con la supervivencia celular o bien que se activen cuando las células son dañadas. Un ejemplo de este tipo de ruta de transducción de señales es el de las PKCs (Protein Kinases C).

Las PKC representan un receptor celular principal para los ésteres de forbol que son conocidos promotores de tumores [32]. Las PKC constituyen una familia de quinatas de serina/treonina dependientes de fosfolípidos con un importante papel en la transducción de señales asociada con una amplia variedad de respuestas celulares, entre las que se incluyen el crecimiento, diferenciación celular, expresión génica, secreción de hormonas, apoptosis y la función de las membranas [33].

Las PKC consisten en al menos 11 isoformas que muestran diversidad en sus estructuras, distribución celular y funciones biológicas y, las cuales se han dividido en tres grupos en base a sus estructuras y requerimientos de cofactores: clásicas, nuevas y atípicas [34]. Las isoformas de PKC clásicas α , β I, β II y γ requieren fosfatidilserina y Ca^{2+} para su actividad. Las isoformas de PKC nuevas δ , ϵ , η y θ no requieren Ca^{2+} como cofactor pero se unen a fosfatidilserina cuando se activan. Ambos grupos de isoformas son activados por 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) o 1,2-diacilglicerol (DAG). Las isoformas de PKC atípicas ξ y λ no requieren Ca^{2+} y no son activadas por TPA o DAG, pero se unen a fosfatidilserina cuando se activan [33].

El TPA activa las isoformas de las PKC clásicas y nuevas induciendo su translocación a sus sitios de acción [33]. La familia de las PKC lleva a cabo sus funciones mediante la regulación de la actividad de factores de transcripción

como AP-1 y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) [35]. Un estudio mostró que el TPA puede inducir la activación rápida y transitoria de NF- κ B a través de la fosforilación y degradación de I κ B [36]. Sin embargo, también se ha demostrado que una activación prolongada de los miembros de la familia de PKC con TPA causa una inhibición de la proliferación, bloqueo del ciclo celular, potenciación de la diferenciación y apoptosis acelerada en varias líneas tumorales [37].

El NF- κ B (Fig.5) participa en muchos procesos celulares como la señalización inmune, la inflamación, la proliferación, la apoptosis y el desarrollo. NF- κ B hace referencia a una familia compuesta por cinco miembros: RelA (también conocido como p65), RelB, c-Rel, p50 y p52, los cuales se encuentran formando homo y heterodímeros [38]. En condiciones normales, se encuentran inactivos en el citoplasma debido a la unión con la familia de inhibidores de κ B (I κ B), compuesta por: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , BCL3, I κ B ϵ , p105 y p100 [39], cuya actividad se encuentra regulada principalmente mediante fosforilación, ubiquitinación y maduración proteosómica o degradación por estímulos activadores de NF- κ B. A través de receptores de membrana, se produce la activación de I κ B β , la cual fosforila la proteína I κ B α , que da lugar a la ubiquitinación, disociación del complejo I κ B α -NF- κ B y la degradación eventual de I κ B α por el proteosoma. A continuación, NF- κ B migra del citoplasma al núcleo y lleva a cabo su acción a través de la unión con el ADN [40] que estimula la producción de otras proteínas como los coactivadores de la ARN polimerasa, que transcribe el ADN en ARN mensajero (ARNm), que a su vez se transforma en proteínas importantes en la función celular.

En varios tipos de cáncer, NF- κ B se encuentra constitutivamente activo y conduce a la célula tumoral hacia la supervivencia y proliferación [39].

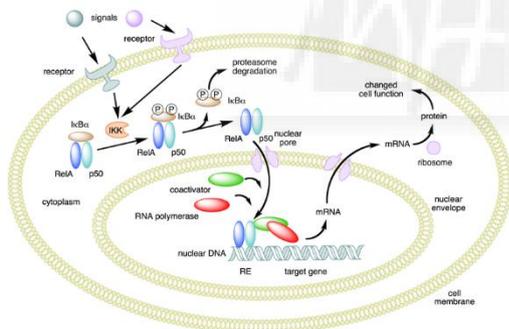


Figura 5. Ruta de transducción de señales de NF- κ B.

2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El objetivo de nuestro grupo es desarrollar una terapia enzimática basada en la generación de ROS como posible tratamiento para tumores quimiorresistentes. Inicialmente, otros investigadores utilizaron como tratamiento contra el cáncer enzimas generadoras de ROS como la xantina oxidasa y la glucosa oxidasa [41]. Sin embargo, dichas enzimas presentaban la principal desventaja de que los sustratos (glucosa, xantina y oxígeno) que utilizaban se encontraban de manera endógena en el organismo y por lo tanto no era posible regular las concentraciones de los mismos y así la actividad de la enzima. Además, eran muy poco estables “in vivo” y se necesitaba de la administración de altas dosis de antioxidantes para proteger al organismo de la toxicidad. [13]

Posteriormente se buscó una enzima que no tuviera estas limitaciones, proponiéndose el uso de la D-aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodothorula gracilis* (EC 1.4.3.3) [42][43], una flavoproteína que cataliza la desaminación oxidativa estereoselectiva de D-aminoácidos en sus correspondientes alfa-cetoácidos, amonio y H_2O_2 (Fig.6) [13]. 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 a altas concentraciones, lo cual favorece que se pueda regular la actividad de la enzima [13].

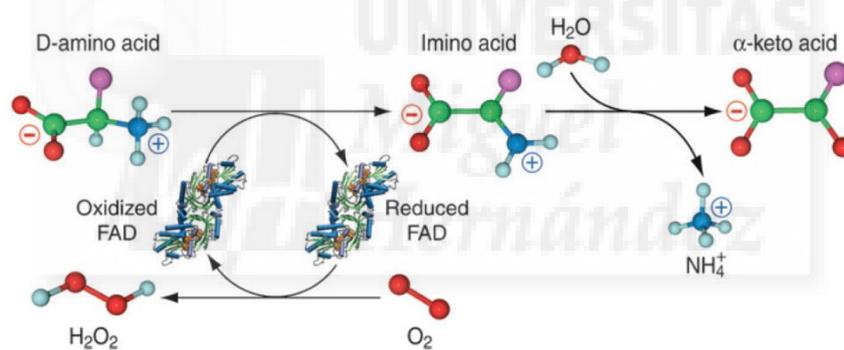


Figura 6. Mecanismo de acción de la D-aminoácido oxidasa (DAO).

En estudios previos de nuestro laboratorio se determinó el efecto de 2 U/ml de DAO (dosis óptima calculada tras varios experimentos de dosis-respuesta) activada con D-Alanina 1 mM en líneas tumorales de carcinoma de colon llegando a la conclusión de que la generación de radicales libres por parte de la DAO era efectiva para producir la muerte celular en este tipo de tumores.

También, con el objetivo de mejorar la eficacia de la terapia, se realizó un estudio de inmovilización de la enzima con nanopartículas magnéticas con un núcleo de magnetita, una cubierta de almidón y funcionalizadas con dietilaminoetanol (DEAE), lo que les permite la unión por afinidad a la DAO funcionalizada con ClytA (Dominio C-terminal de la amidasa N-acetilmuramoil-L-Alanina). Dichas nanopartículas carecían de citotoxicidad y se unían a la enzima por una unión no covalente por lo que la liberación se podía realizar de manera controlada. Lo que se pudo comprobar en ensayos in vitro, con condiciones variables de pH y temperatura, es que la actividad de la DAO cuando está inmovilizada en nanopartículas magnéticas es más estable en un rango mayor de temperatura y pH [44], pudiendo por tanto mantener su actividad a pHs más ácidos, lo cual es muy importante puesto que el pH en

los tumores es más ácido que el de las células sanas [22]. También se ensayó su actividad en líneas celulares pudiéndose comprobar que efectivamente la enzima mantiene su actividad durante más tiempo a 37°C que en su estado libre [45]. La muerte celular en todos estos experimentos en nuestro laboratorio se comprobó mediante análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

El ciclo celular consta de varias etapas (Fig.7). La primera se conoce como fase G₁, en la que las células presentan una dotación cromosómica diploide (2n) y tiene lugar el crecimiento de las células junto con la síntesis de proteínas y el ARN. La segunda etapa es la fase S o de síntesis, en ella se produce la replicación o síntesis del ADN, de modo que cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. La fase G₂ es la tercera fase, en ella continua la síntesis de proteínas y de ARN, al final de esta etapa se observan cambios en la estructura celular que indican el principio de la división celular, por lo que termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis. La última fase es la M o de mitosis, que consiste en la división celular en la que una célula progenitora se divide en dos células hijas idénticas. Por otra parte, también puede aparecer una población de células en la denominada “fase sub-G₁” en la cual se encuentran aquellas células que han sufrido un daño en el ADN que hace que se encuentren en proceso de muerte celular y que es la que nos permitió determinar el efecto de la DAO sobre las células tumorales de colon.

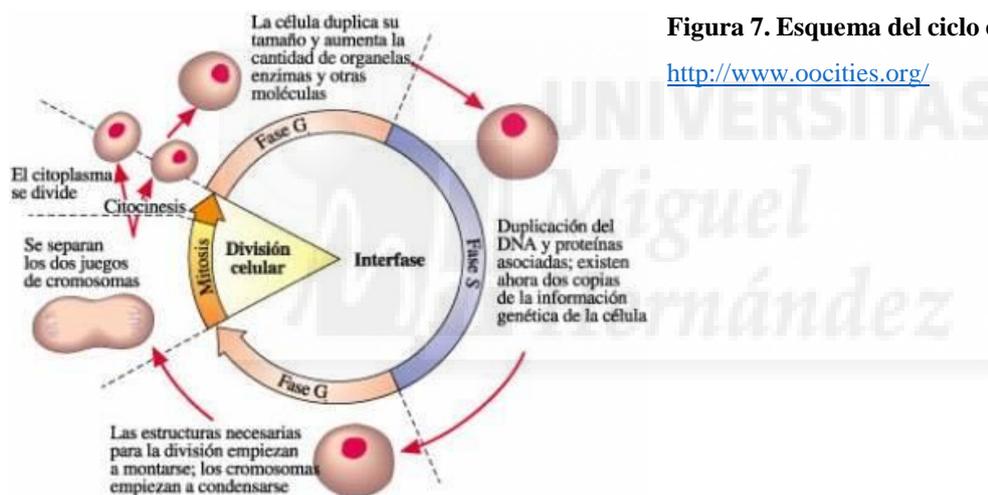


Figura 7. Esquema del ciclo celular. Obtenida de:

<http://www.oocities.org/>

Según lo explicado, podemos observar en la figura (Fig.8) que, en la mayoría de las líneas celulares de carcinoma de colon previamente estudiadas en nuestro grupo de investigación, cuando se añade la DAO junto con su sustrato tiene lugar un aumento de la fracción de células en fase sub-G₁, es decir, aumenta el porcentaje de células muertas. Sin embargo, podemos apreciar que hay una línea que es parcialmente resistente, en la cual cambia el ciclo celular y se aprecia un bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular, pero no se aprecia muerte celular cuando se añade la DAO y su sustrato, es el caso de las HT-29 en las que ocurre, por tanto, un efecto citostático.

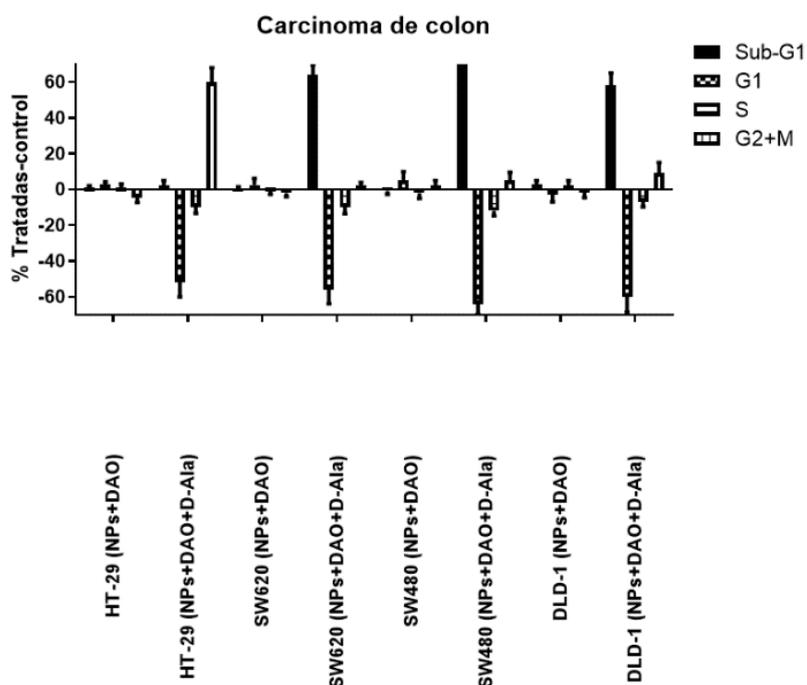


Figura 8. Incremento o decremento del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras sustraer el porcentaje de células en esa fase en las células no tratadas con DAO y D-Ala. En la figura se representan los resultados en las líneas celulares tumorales de colon (HT-29, SW620, SW480, DLD-1). Está representada la media±SD, con un n≥3.

Tras obtener estos resultados en carcinoma de colon y coincidiendo con mi incorporación al laboratorio se decidió realizar un cribado en otras líneas celulares tumorales de diverso origen, para determinar si el efecto de la DAO sobre las líneas celulares de carcinoma de colon era extrapolable a otros tipos de tumores. Además, se decidió estudiar la toxicidad de la DAO sobre líneas celulares no tumorales, constituyendo estos experimentos los primeros objetivos de este TFG. Posteriormente y como consecuencia de los resultados obtenidos en diferentes modelos tumorales, se planteó la necesidad de determinar si la muerte inducida por la DAO en glioblastoma seguía el mismo patrón de la muerte celular inducida por la DAO en carcinoma de páncreas exocrino y en carcinoma de colon. La caracterización de la muerte celular inducida por la DAO en líneas y cultivos primarios de glioblastoma y su comparación con el efecto de la DAO en modelos celulares de carcinoma de colon y páncreas constituye otro de los objetivos de este TFG. Finalmente, tras los resultados obtenidos en el primer cribado en una línea celular de eritroleucemia humana, y su comparación con los resultados obtenidos en linfocitos no tumorales que sugerían un efecto diferencial sobre las células neoplásicas hematopoyéticas, decidimos iniciar un estudio piloto enfocado a probar la eficacia del tratamiento enzimático con DAO y D-Alanina en cultivos primarios obtenidos de sangre periférica en colaboración con el Servicio de Hematología del Hospital General Universitario de Elche y la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del HGUE, incluyendo muestras de pacientes con leucemia aguda y pacientes no oncológicos como control.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFG es evaluar la utilización de un tratamiento enzimático con la DAO como posible terapia antitumoral en diferentes tipos de neoplasias.

Los objetivos específicos en los que se ha dividido el trabajo son:

OBJETIVO 1: Realizar un cribado de líneas celulares tumorales de diverso origen para determinar si el efecto de la DAO en colon es extrapolable a otros tipos de cáncer.

OBJETIVO 2: Determinar si el tratamiento con la DAO produce muerte celular sobre diferentes líneas celulares no tumorales.

OBJETIVO 3: Determinar si el mecanismo de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO en carcinoma de colon y páncreas es similar al mecanismo de acción de la DAO en glioblastoma.

OBJETIVO 4: Determinar si existe un efecto diferencial de inducción de muerte celular por la DAO en cultivos primarios de linfocitos aislados de muestras de sangre periférica de pacientes del Hospital General Universitario de Elche (HGUE) no oncológicos o pacientes con leucemia aguda.

OBJETIVO 5: Determinar si las vías de transducción de señales mediadas por las PKCs clásicas y la vía de NFκB pueden modular los efectos de la DAO en células hematopoyéticas.



3 MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cuantificación de la DAO

El enzima fue obtenido del grupo del doctor Jesús Sanz a partir del cultivo de la proteína quimérica Clyt-DAO cuyo ADN recombinante se expresa a partir del plásmido pCPC21 en la cepa bacteriana de *E.coli* BL21 (DE3). El enzima es posteriormente purificado en virtud de la afinidad del dominio Clyt por la colina del extracto bacteriano mediante cromatografía de afinidad en columna de DEAE celulosa. El enzima purificado es cuantificado mediante espectroscopia UV-visible utilizando un espectrofotómetro “Evolution 201” (Thermo scientific). El rango de lectura es de 240 a 320 nm y como blanco se utiliza un tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7.5 y glicerol al 10%.

2. Ensayo de actividad de la DAO

La actividad de la DAO se mide con la cuantificación del producto de la reacción de la DAO con su sustrato. Para ello, se mezclan 10 µg de DAO, D-fenilglicina 15 mM y tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7.5 con glicerol al 10% y se deja la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo la reacción se para con ácido acético glacial al 99%, que deforma la proteína, la cual deja de ser funcional, y se centrifuga a 13000 rpm durante 3 minutos.

El producto de la reacción anterior es el ácido benzoil-fórmico ($\epsilon_{252} = 12253 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), cuya concentración se determina mediante espectrofotometría a 252 nm. Así, una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 nmol de producto por minuto a 25°C y pH 7.5. Además, siempre hay que calcular la actividad específica que nos indicará si la proteína está en buenas condiciones, para lo cual dicha actividad se debe encontrar entre 3500 y 4500 nmol/min·mg.

Finalmente, siempre habrá que filtrarla con un filtro cuyo diámetro de poro sea 0.2 µm.

3. Líneas celulares

Para el desarrollo del estudio se utilizaron las líneas celulares: RWP-1 (carcinoma de páncreas exocrino), LN-229, U-87, T-98 (glioblastoma), SH-SY5Y (neuroblastoma), JIMT-1 (carcinoma de mama), y K-562 (eritroleucemia humana).

Además también fue necesario contar con líneas celulares no tumorales, en concreto trabajamos con dos líneas celulares de fibroblastos no tumorales, 1BR3G y IMR90, y una línea celular de células pancreáticas no tumorales, HPDE.

Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂. Se ha utilizado medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con GlutaMAX™, el cual contiene 4.5g/l de D-Glucosa suplementado con Penicilina/Estreptomina (PAA) en una proporción final del 1% y suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) en una proporción del 10%, excepto para la línea celular K562 para la cual se utilizó medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con L-Glutamina a una concentración final de 2 mM, Penicilina/Estreptomina (BioWhittaker) a una concentración final de 50 U/ml, Piruvato sódico (BioWhittaker) a una concentración final de 1 Mm y suero fetal bovino (SBF) en una proporción del 10%.

4. Muestras biológicas

Las muestras de sangre periférica, tanto de pacientes con leucemia aguda como de pacientes no oncológicos, fueron suministradas por la unidad de Hematología del Hospital General Universitario de Elche (HGUE). Se obtuvo la aprobación del Comité Ético y de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Elche para estos estudios y las muestras fueron recogidas en exámenes de rutina tras la firma del consentimiento informado por todos los participantes.

De todos los casos de leucemia se trabajó únicamente con las agudas, teniendo así más de un 20% de blastos, y en cuanto a los pacientes sanos se seleccionaron aquellos que no tuvieran desórdenes que pudieran afectar a los resultados del ensayo, fundamentalmente no oncológicos ni infectivos. Todas las muestras fueron cultivadas a 37°C y con un 5% de CO₂. Se utilizó el medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con L-Glutamina a una concentración final de 2 mM, Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker) a una concentración final de 50 U/ml, Piruvato sódico (BioWhittaker) 1 Mm y suero fetal bovino (SBF) en una proporción del 10%.

Para el tercer objetivo también se contó con cultivos primarios obtenidos por otra compañera del laboratorio a partir de lavados quirúrgicos de pacientes operados de glioblastoma en el HGUE. En este caso también fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ pero utilizando el medio DMEM/F12 con GlutaMAX™, el cual contiene 4.5g/l de D-Glucosa suplementado con Penicilina/Estreptomicina (PAA) en una proporción final del 1% y suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) en una proporción del 10% y además está enriquecido con la mezcla de nutrientes Ham's F-12. Además, se trabajó con adipocitos proporcionados por el IBMC, se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂ y con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con GlutaMAX™, el cual contiene 4.5g/l de D-Glucosa suplementado con Penicilina/Estreptomicina (PAA) en una proporción final del 1% y suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) en una proporción del 10%.

5. Preparación de placas para realizar los experimentos

Las muestras de sangre fueron primero tratadas con buffer EL (Erythrocyte Lysis) con lo que se consiguió lisar los eritrocitos presentes tras 30 minutos en una cámara a 4 grados centígrados y se separaron del resto de la muestra con 15 minutos de centrifuga a 1300 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se volvió a realizar el proceso con el mismo buffer.

Las células del pellet fueron cultivadas 24 horas antes de empezar los tratamientos en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con L-Glutamina a una concentración final de 2 mM, Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker) a una concentración final de 50 U/ml, Piruvato sódico (BioWhittaker) a una concentración final de 1 Mm y suero fetal bovino (SBF) en una proporción del 10%. Las células se mantuvieron en placas de cultivo de 6 pocillos cada una con 3 ml de medio y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

6. Tratamientos

En los tratamientos iniciales se trataron las células con una concentración final de DAO de 2 U/ml y su sustrato D-Alanina 1 mM. Los controles utilizados fueron: medio, DAO libre y D-Alanina, a las concentraciones utilizadas

en los tratamientos conjuntos. Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.

En tratamientos posteriores en los que se intentaba determinar el efecto de las PKCs y el factor de transcripción NF-κB en la sensibilidad y/o resistencia a los efectos de la DAO, se añadió a los cultivos la DAO activada con la D-Ala en presencia y/o ausencia de TPA 1 μM e inhibidor de NFKβ 5 μM combinados o no entre ellos.

7. Ciclo celular

Citómetro BD FACSCanto™ II.

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, se determinó mediante citometría de flujo empleando un citómetro BD FACSCanto™ II.

El ADN se marca con yoduro de propidio, un agente intercalante fluorescente que se excita a longitudes de onda de 480nm y emite fluorescencia roja a 620nm, aproximadamente. Gracias a ello las células emitirán mayor o menor fluorescencia según su contenido en ADN.

El contenido en ADN de cada célula varía en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentre (fase G₁, fase S o de síntesis de ADN, fase G₂ y fase M o de mitosis). Cuando las células se encuentran en la fase G₂/M del ciclo celular poseen una dotación cromosómica tetraploide (4n), ya que han superado la fase S de síntesis, por ello la fluorescencia que van a emitir será el doble que las que estén en fase G₁ que tendrán dotación cromosómica diploide (2n). Las células que estén en la fase S tendrán una señal intermedia entre la señal de G₁ y la de G₂/M. Las células muertas que posean el ADN fragmentado emitirán menor fluorescencia que las células que posean un ADN íntegro, es decir, que estén en la fase subG₁. (Fig.9)

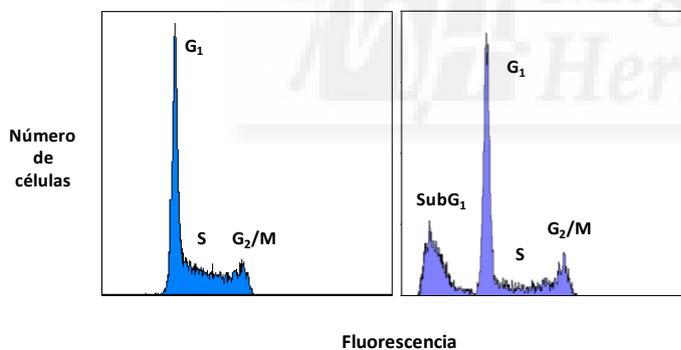


Figura 9. Perfiles de ciclo celular obtenidos por citometría de flujo mediante el marcaje del ADN con yoduro de propidio.

Transcurrido el periodo de tratamiento las células se centrifugan y se resuspenden en tampón PBS (tampón de fosfato salino) 1X. El precipitado celular se fija en etanol frío al 75% durante al menos una hora a -20°C, tras lo cual, se centrifugan a 1100 rpm durante 5 minutos. Al precipitado de células se le añaden 0.5 ml de una mezcla que contiene PBS con Tritón x-100 al 0.5%, 25 μg/ml de ARNasa A (Serva) y 25 μg/ml de yoduro de propidio (Sigma Aldrich), dejándolas en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, empleando el citómetro BD FACSCanto™ II se determina la distribución de fases del ciclo celular.

Citómetro Beckman Coulter Navios

Se identificaron y diferenciaron las diferentes poblaciones de células mediante citometría de flujo empleando un citómetro Beckman Coulter Navios de la unidad de Hematología del Hospital General Universitario de Elche

(HGUE) que nos permitió su utilización. Este instrumento incorpora 12 detectores que incluyen 10 detectores de fluorescencia y 2 de dispersión de luz.

Para poder determinar las poblaciones afectadas por los tratamientos y combinaciones de tratamientos testados es imprescindible realizar una inmunofenotipificación con marcadores unidos a conjugados que permiten la identificación (Fig.10). Esta se realiza gracias a un panel de marcadores escogidos para conocer la variación sufrida en las células de las muestras en estudio. En nuestro caso se utilizó el panel rutinario para estos tipos de enfermedades de la unidad de hematología del HGUE.

En primer lugar, tras el periodo de tratamiento, las células se centrifugan a 1300 rpm 15 minutos y se resuspenden en 200 µl de PBS, en los cuales se añaden los marcadores: de CD13- FITC y CD14-PE, ambos marcadores de linaje, se añaden 20 µl, mientras que de CD117-PC5.5 y CD33-APC, dos marcadores de linaje, CD34-PC7 y CD45-KrO, dos marcadores de madurez y CD15-PB, un marcador para sub-clasificar el tipo de leucemia, se añaden 10 µl. Las muestras deben de estar con los marcadores unos 15 minutos en incubación a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez pasado el tiempo de incubación se añade 1 ml de PBS a las muestras y se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos, tras los cuales se elimina el sobrenadante y se añaden 500 µl de PBS para adquirir el resultado en el citómetro.

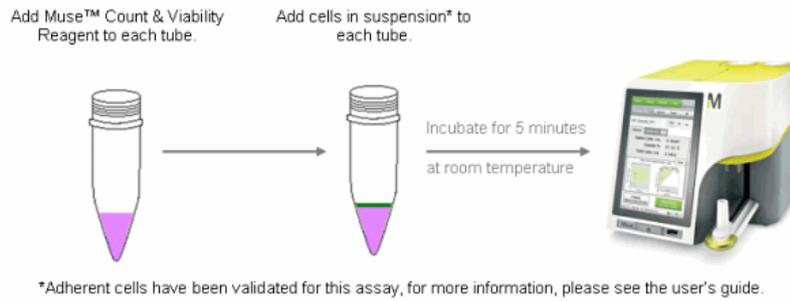
405 nm EXCITATION		488 nm EXCITATION					638 nm EXCITATION		
PB ¹	KrO ²	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-A700 ³	APC-A750 ⁴

Figura 10. Longitud de onda de excitación de los conjugados a los marcadores para citometría de flujo.

8. Ensayo de conteo y viabilidad celular

El Kit de conteo y viabilidad de Muse® permite realizar una determinación rápida y fiable de la viabilidad y el número total de células utilizando el Analizador Celular Muse®. Este kit se basa en el uso de dos colorantes que se unen al ADN con permeabilidades diferentes. El colorante nuclear tiñe únicamente células nucleadas, mientras que el colorante de viabilidad tiñe intensamente células muertas y en proceso de muerte. Esta combinación de colorantes permite distinguir las células viables de las muertas. Además, el ruido es excluido de los resultados en base a una tinción negativa con el colorante nuclear.

En primer lugar, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos y, tras 24 horas se realizó el tratamiento correspondiente. Una vez finalizado el tratamiento, las células se dejaron en medio fresco o bien en PBS 1X. A continuación, las células se tiñeron con el reactivo de Contaje y Viabilidad de Muse® obteniendo una concentración final entre 1×10^4 y 5×10^5 células/ml. En función del número de células presentes se añadió una cantidad u otra de reactivo. Finalmente, se dejaron las células 5 minutos a temperatura ambiente y, pasado este tiempo se realizó la medición con el Analizador Celular Muse® (Fig.11).



Conc. Of Original Cell Suspension	Dilution Factor	Cell Suspension Volume	Count & Viability Reagent Volume
1×10^5 to 1×10^6 cells/mL	10	50 μ L	450 μ L
1×10^7 to 1×10^7 cells/mL	20	20 μ L	380 μ L
$>1 \times 10^7$ cells/mL	40	20 μ L	780 μ L

Figura 11. Protocolo de ensayo para el conteo y el análisis de la viabilidad celular.

9. Kit de detección de citotoxicidad (LDH)

El Kit de detección de citotoxicidad^{PLUS} (Roche) es un ensayo colorimétrico para la cuantificación de muerte y lisis celular, el cual se basa en la medida de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio desde el citoplasma de las células dañadas. La lactato deshidrogenasa es una enzima citoplasmática presente en todas las células, la cual es rápidamente liberada al sobrenadante del cultivo cuando la membrana plasmática es dañada. La actividad LDH es determinada en una prueba enzimática (Fig.12): en el primer paso el NAD^+ es reducido a NADH/H^+ por la conversión de lactato a piruvato catalizada por la LDH y, en el segundo paso el catalizador (diaforasa) transfiere H/H^+ del NADH/H^+ a la sal de tetrazolio INT (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio) que se reduce a formazán.

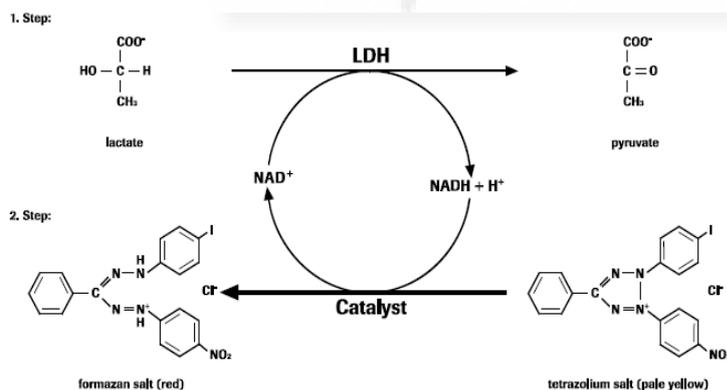


Figura 12. Ensayo para medir la LDH liberada. En el primer paso, la LDH liberada reduce el NAD^+ a NADH^+/H^+ , oxidando el lactato a piruvato. En la segunda reacción enzimática, con la ayuda de un catalizador se transfieren dos hidrógenos desde el NADH^+/H^+ a la sal de tetrazolio amarilla INT.

Este tipo de ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos, en la que se crecieron las células y, pasadas 24 horas, se realizaron los tratamientos. Para llevar a cabo el estudio, se realizaron los siguientes controles: medio libre de células, las células con el medio sin ningún tratamiento, las células con el medio y tampón de lisis (control positivo) y el tratamiento (DAO y D-Alanina) sin células. Además, las células fueron tratadas con DAO (2 U/ml), con D-Alanina (1 mM) y con ambas simultáneamente. El tratamiento se dejó durante 24 horas y, antes de realizar el estudio de los resultados, se añadió el tampón de lisis en el control positivo durante 15 minutos.

Para determinar la actividad LDH, se añadieron 100 μ l de mezcla de reacción a cada pocillo, la cual contiene el catalizador y la solución de tinción, y se dejó incubar la placa durante 30 minutos a una temperatura entre 15 y

25°C. Seguidamente, se añadieron 50 µl de la solución de parada y se midió la absorbancia de las muestras a 492 nm en el lector de placas Anthos labtec instruments.

10. Evaluación de la permeabilidad de membrana

El yoduro de propidio es una molécula fluorescente impermeable a la membrana celular y capaz de intercalarse en el ADN, de modo que este compuesto puede ser utilizado para teñir aquellas células cuya permeabilidad de membrana haya sido modificada. De este modo, se utilizó la tinción celular con yoduro de propidio con el objetivo de estudiar si el tratamiento, con la DAO y la D-Alanina, generaba daños en la membrana celular.

Para ello, inicialmente se crecieron las células en placas de 6 pocillos y seguidamente fueron tratadas con DAO y D-Alanina durante tiempos cortos (1, 3 y 6 horas). Pasado este tiempo, se retiró el medio de las células y se les añadió PBS junto con yoduro de propidio a una concentración final de 15 µg/ml. La placa se mantuvo 20 minutos en oscuridad y, a continuación, las células teñidas se observaron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U) equipado con una cámara digital (Nikon DS-1QM).

11. Conteo celular y evaluación de viabilidad por el método de Trypan Blue.

El Trypan blue es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas por lo que es útil para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación ya que no puede penetrar ni teñir células vivas.

En este procedimiento, una suspensión de células es mezclada con una solución al 0.4% de Trypan blue antes de ser observada bajo el microscopio y contada haciendo uso de una cámara de Neubauer. Para realizarlo se hace una mezcla isovolumétrica de Trypan blue y suspensión celular aunque también se puede hacer uso de otros tipos de diluciones, especialmente para suspensiones celulares muy concentradas, siempre considerando el factor de dilución correspondiente en los cálculos finales. La solución resultante se coloca sobre la cámara de Neubauer y se observa al microscopio óptico (la cámara de Neubauer consta de 4 campos ópticos: campo visual superior izquierdo y derecho e inferior izquierdo y derecho). Al observarlas se procede a realizar un conteo del número de células presentes en cada campo visual obteniéndose el número total de células, el número de células viables y el número de células inviables.

El número de células por ml se obtiene multiplicando la media de células por campo visual por el factor de dilución del cultivo con el Trypan blue y por $1 \cdot 10^4$. El resultado obtenido corresponde al número de células viables/ml o inviables/ml (según se hayan contado las células teñidas o no con el colorante). Para la determinación de la viabilidad y mortalidad celular hay que tener en cuenta el recuento total de células (no teñidas y teñidas):

% Viabilidad celular = $(n^\circ \text{ de células viables} / n^\circ \text{ total de células}) \times 100$

% Mortalidad celular = $(n^\circ \text{ total de células} - n^\circ \text{ de células viables} / n^\circ \text{ total de células}) \times 100$

12. Análisis estadístico

Las diferencias de las medias obtenidas en los distintos ensayos se compararon, donde consideramos necesario, utilizando el test estadístico de la t de Student. Se estimaron estadísticamente significativas a partir de $*p < 0.05$.

4 RESULTADOS

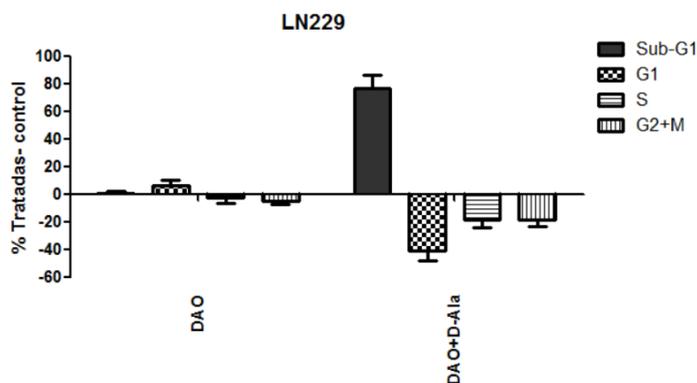
OBJETIVO 1: Realizar un cribado de líneas celulares tumorales de diverso origen para determinar si el efecto de la DAO en colon es extrapolable a otros tipos de cáncer.

Siguiendo los resultados obtenidos al tratar con la DAO y en presencia de su sustrato, la D-Alanina, en carcinoma de colon, se realizó un cribado de líneas celulares tumorales para determinar si el efecto de la DAO activada en carcinoma de colon era extrapolable a otros tipos de cáncer.

El primer paso durante mi estancia en el laboratorio fue realizar un cribado con distintas líneas celulares para, primero, comprobar si la DAO causaba algún efecto sobre las células por sí misma y después, probar el efecto sobre la viabilidad celular al tratar con la DAO y su sustrato, la D-Alanina.

Para ello se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular en el que se escogieron las siguientes líneas celulares: LN-229 de glioblastoma, SH-SY5Y de neuroblastoma, RWP-1 de carcinoma de páncreas exocrino y K-562 de eritroleucemia humana. Los tratamientos ensayados fueron únicamente la DAO 2 U/ml y la enzima a la misma concentración junto con D-Alanina 1 Mm, que eran las condiciones óptimas estimadas en los experimentos de carcinoma de colon. Tras 24 horas de haber realizado el tratamiento se llevó a cabo el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo haciendo uso del citómetro BD FACSCanto™ II. Este tipo de ensayos nos permite discriminar si los efectos observados son citotóxicos, implicando muerte celular, citoestáticos, implicando un bloqueo en alguna de las fases del ciclo celular, o una combinación de ambos.

En los resultados, representados como la diferencia en el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular en la muestra tratada una vez sustraído el porcentaje de células en la misma fase del ciclo celular en la muestra control no tratada (Fig.13) se puede apreciar que los efectos tóxicos de la enzima por sí sola son prácticamente nulos. Sin embargo, al añadir la DAO junto con su sustrato, la D-Alanina, el porcentaje de células muertas se incrementa considerablemente en comparación con los controles como se puede observar por el porcentaje de células en sub-G₁, alcanzándose en el caso de la línea celular LN-229 un $77.5 \pm 9\%$. Por tanto, la DAO activada está causando un efecto citotóxico en las líneas celulares ensayadas.



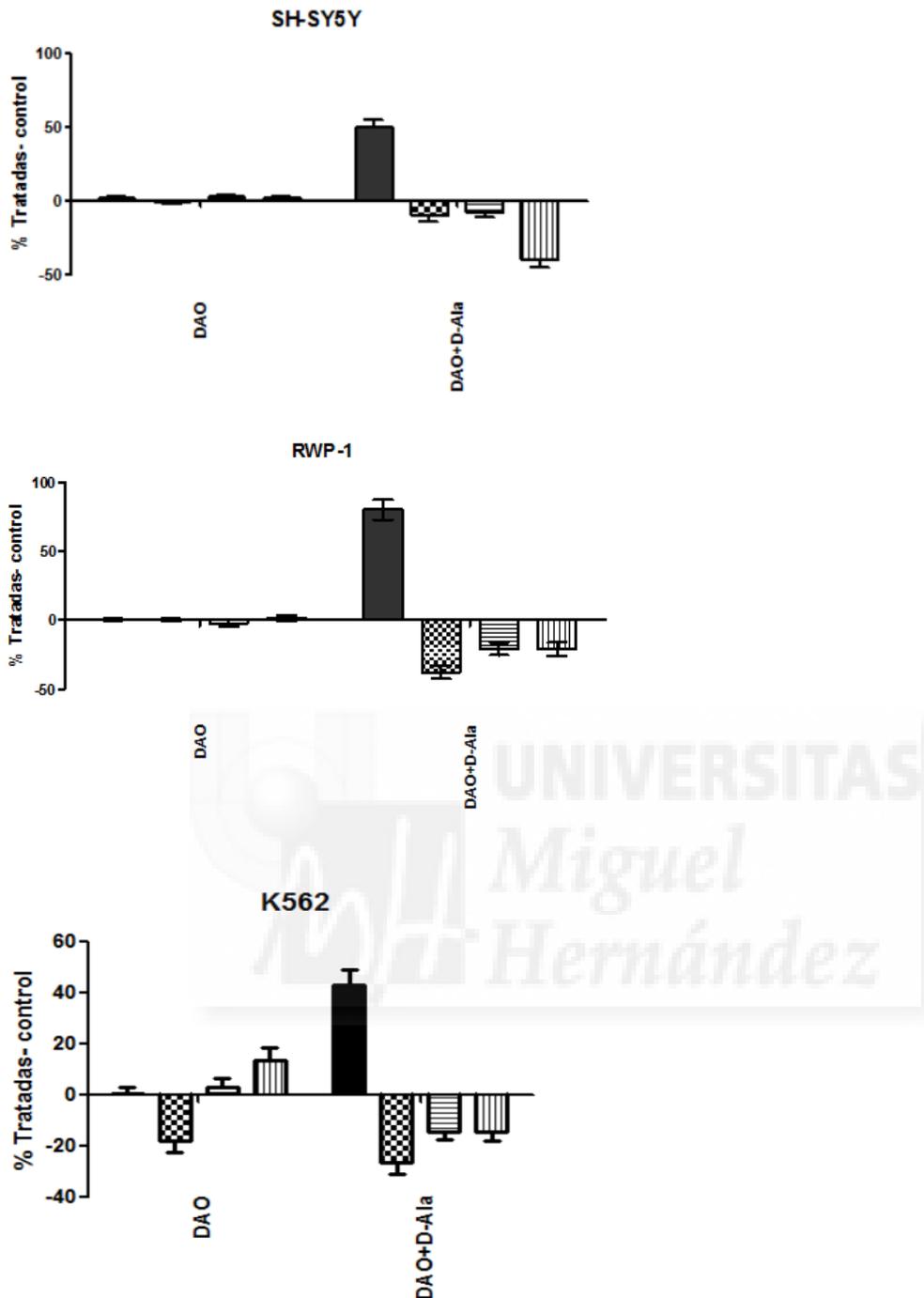


Figura 13. Ciclo celular de las líneas celulares de LN-229 de glioblastoma, SH-SY5Y de neuroblastoma, RWP-1 de carcinoma de páncreas exocrino y K-562 de eritroleucemia humana al tratar con la DAO sola y activada con D-Alanina. Está representada la media \pm SD, con un $n \geq 3$.

Tras estos ensayos de ciclo celular decidimos determinar el efecto de la enzima mediante ensayos de MTT, aunque dicho método no permite distinguir efectos citotóxicos de citoestáticos, en las diferentes líneas celulares. En los resultados (Fig.14) se observa una disminución de la proliferación y que la DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas tiene un efecto superior al producido por la enzima libre en las dosis más bajas, tal y como se había determinado anteriormente en nuestro laboratorio. En la figura se muestra como ejemplo una MTT con RWP-1. Una vez comprobado este hecho se continuó trabajando con la DAO libre por razones económicas y de

disponibilidad del enzima.

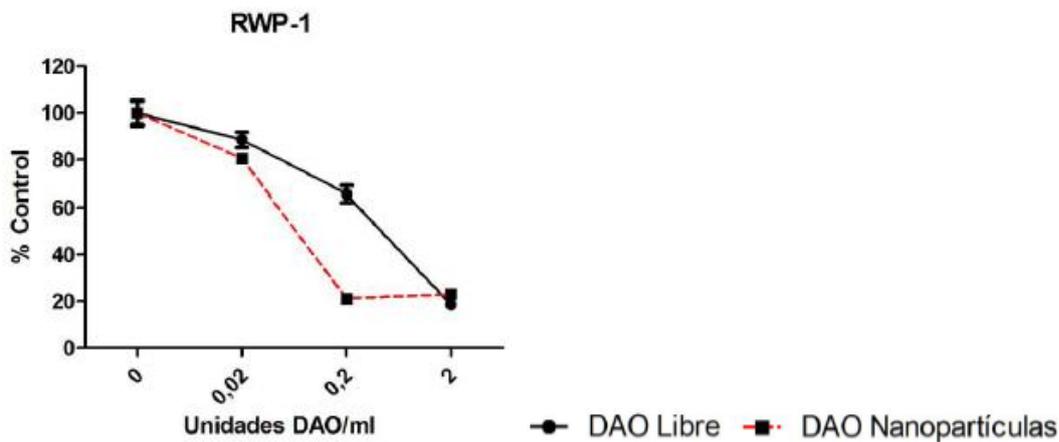


Figura 14. Diferencias en el efecto de la DAO libre e inmovilizada en nanopartículas magnéticas a diferentes concentraciones sobre la línea celular RWP-1. Los datos representan la media \pm SD, con un $n \geq 6$.

También se disponía en el laboratorio de una línea de cáncer de mama, la JIMT-1, que presenta una sobreexpresión de erb2 lo que la hace especialmente resistente a las terapias con antineoplásicos clásicos como las antraciclinas, por lo que resultaba especialmente interesante determinar si la DAO podía constituirse en una nueva estrategia terapéutica en este tipo de células. Para comprobar si era sensible o no al efecto de la DAO y su sustrato y si dicho tratamiento tenía efecto, al igual que en las anteriores líneas celulares, se realizaron ensayos de ciclo celular. En dichos ensayos se observó que el efecto de la DAO era fundamentalmente citostático, ya que aparecen bloqueadas mayoritariamente en la fase G₂/M del ciclo sin aparente muerte celular en las primeras 24h después del tratamiento (Fig.15).

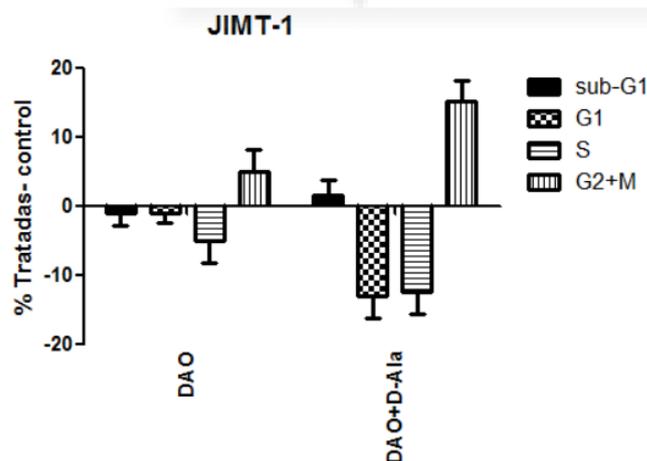


Figura 15. Estudio del ciclo celular de la línea celular de cáncer de mama JIMT-1 tratada con DAO sola o activada con D-Alanina. Está representada la media \pm SD, con un $n \geq 3$.

Con estos resultados podemos afirmar que realmente al tratar con la DAO activada con su sustrato, la D-Alanina, diferentes líneas celulares tumorales se causa un efecto citotóxico en muchas de ellas y un efecto citostático con bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular en algún caso (JIM-T1).

OBJETIVO 2: Determinar si el tratamiento con la DAO produce muerte celular sobre diferentes líneas celulares no tumorales.

Una vez demostrado que el efecto de la DAO en colon era extrapolable a los diferentes modelos estudiados en el anterior objetivo, surgió la duda de si el efecto de la DAO sería un efecto tóxico general, y por tanto inespecífico, sobre todo tipo de células. Para determinar si este era el caso, estudiamos el efecto de la DAO sobre diferentes modelos celulares no tumorales. Primero realizamos estos experimentos añadiendo la enzima junto con su sustrato, la D-Alanina, a linfocitos control obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes rutinarios no oncológicos ni infectivos del Hospital General Universitario de Elche. Los resultados de este estudio mostraron que prácticamente no había efecto ya que el ciclo se mantiene aparentemente estable tras el tratamiento. Este resultado es destacable en comparación con el obtenido anteriormente con la línea de eritroleucemia humana K-562, sobre la cual se producía un claro efecto citotóxico tras añadir la enzima y su sustrato. (Fig.16)

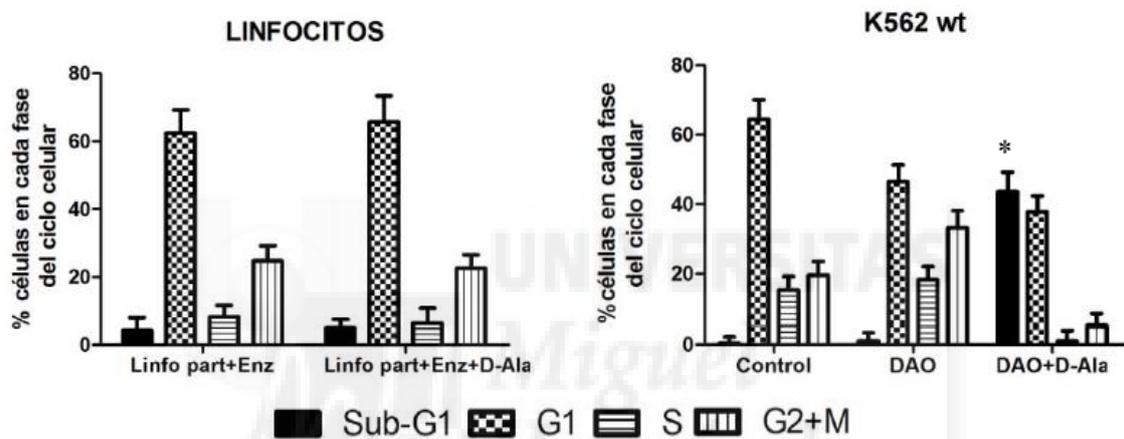


Figura 16. Diferencias observadas en los ciclos celulares de los linfocitos sanos con respecto a una línea celular de eritroleucemia humana (K-562) en respuesta a la DAO activada con su sustrato D-Alanina. Está representada la media \pm SD, con un $n \geq 3$. Test t de Student: * $p < 0.05$.

Por otra parte, también se realizaron estos experimentos sobre otras líneas celulares no tumorales para corroborar que efectivamente la DAO junto con su sustrato sólo tiene una respuesta determinante en líneas celulares tumorales y por tanto presenta cierta selectividad hacia dichas células. Las líneas celulares de las que se disponía para continuar confirmando la hipótesis eran dos líneas de fibroblastos, 1BR3G e IMR90 y una línea de células pancreáticas humanas no tumorales, la HPDE. Los resultados mostraron una baja toxicidad de la DAO sobre estos modelos si se compara con la obtenida en las líneas tumorales (Fig.17).

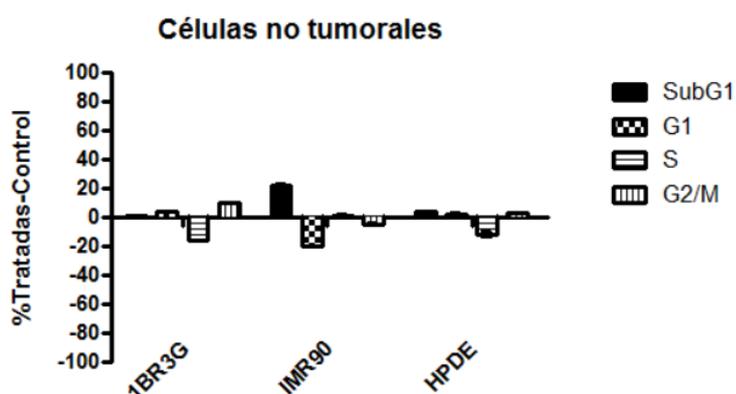


Figura 17. Ciclo celular de líneas celulares no tumorales tratadas con DAO 2 U/ml y D-Alanina 1 mM. 1BR3G e IMR90 son líneas celulares de fibroblastos mientras que HPDE es una línea celular de células pancreáticas humanas no tumorales. Está representada la media \pm SD, con un $n \geq 3$.

Esta respuesta también se comprobó sobre adipocitos de rata, obteniéndose un resultado similar al anterior. Nos llamó la atención que pareciera que disminuía el tamaño de los depósitos de grasa acumulada en ellos sin que aparentemente sufrieran muerte celular (Fig.18). Para corroborar este hecho se realizó un ciclo celular como los anteriormente incluidos en este trabajo (Fig.19) y como se puede observar, el ciclo no sufre apenas cambios y las células en fase sub-G₁ no aumentan con el tratamiento por lo que la DAO activada sólo ha afectado al contenido en grasa de estas células.

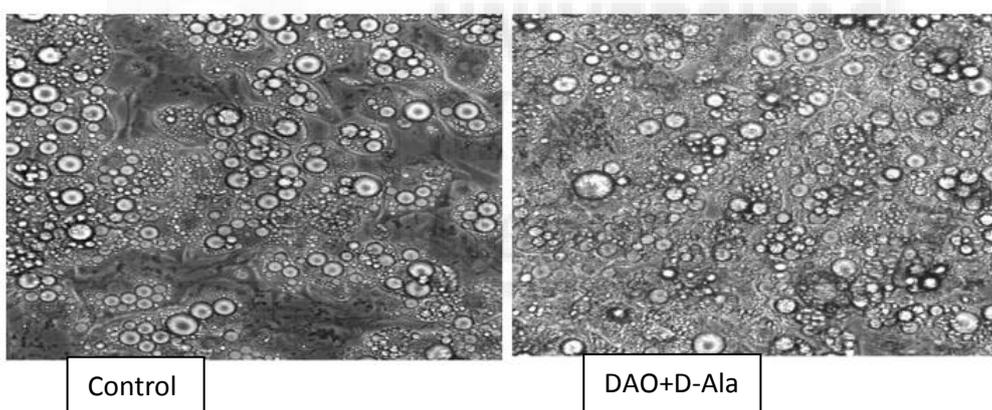


Figura 18. Imágenes obtenidas al microscopio óptico donde se pueden observar adipocitos de rata sin tratar y tratados con la DAO y la D-Alanina.

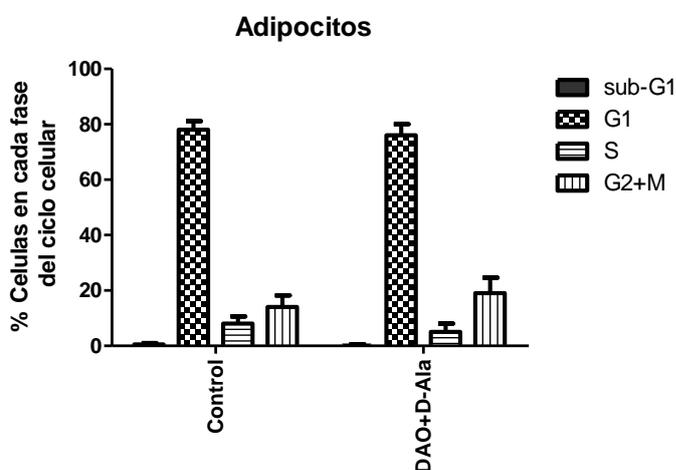


Figura 19. Estudio del ciclo celular de adipocitos de rata sin tratar y tratados DAO y D-Alanina. Está representada la media \pm SD, con un $n \geq 3$.

OBJETIVO 3: Determinar si el mecanismo de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO en carcinoma de colon y páncreas es similar al mecanismo de acción de la DAO en glioblastoma.

En nuestro laboratorio se habían realizado previamente estudios sobre los mecanismos de muerte celular inducida por la DAO en carcinoma de páncreas y colon, ya que estos tumores constituyen un objetivo prioritario de nuestro grupo de investigación. Los resultados mostraban que la DAO inducía muerte celular a través de un tipo de necrosis, posiblemente parthanatos, en dichos modelos celulares.

Por otro lado, en la figura (Fig.20) observamos que, excepto en la línea celular LN-229 utilizada en el objetivo 1, sobre otras líneas celulares de glioblastoma y cultivos primarios obtenidos de lavados quirúrgicos de pacientes operados de esta patología, la DAO inducía muerte celular en menor grado de lo que lo hizo en los modelos de carcinoma de páncreas exocrino y colon estudiados anteriormente en el laboratorio y durante este trabajo de fin de grado.

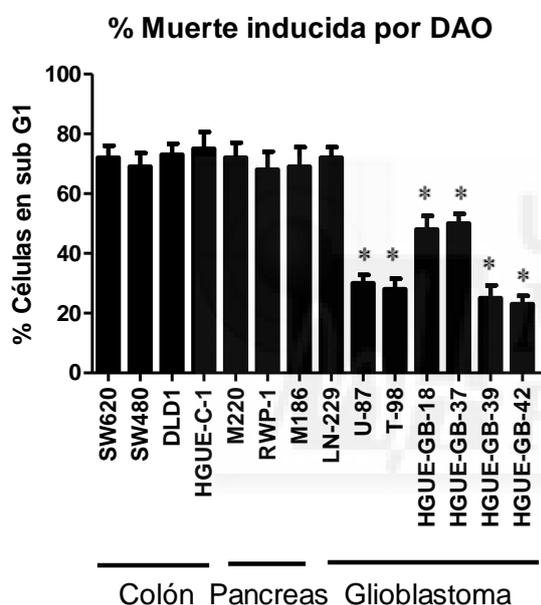


Figura 20. Estudio del porcentaje de células en la fase sub-G₁ del ciclo celular de las líneas celulares y cultivos primarios de glioblastoma (LN-229, U-87, T-98, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42), carcinoma de páncreas exocrino (M220, RWP-1 y M186) y carcinoma de colon (SW620, SW480, DLD-1 y HGUE-C-1) tratadas con DAO y D-Alanina. Está representada la media \pm SD, con un $n \geq 3$. Test t de Student: * $p < 0.05$.

Para determinar si existían diferencias en los mecanismos moleculares de inducción de muerte celular llevados a cabo por la DAO entre los carcinomas de páncreas y colon y los glioblastomas se han realizado estudios de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo tras haber tratado las diferentes líneas celulares de glioblastoma con DAO y D-Ala en presencia y ausencia de inhibidores de diferentes tipos de muerte celular. Para nuestra sorpresa, en los resultados se observó que cuando se añadían inhibidores de caspasas (ICn) en estas líneas celulares de glioblastomas, la muerte celular inducida por la DAO era en parte bloqueada, mientras que estos inhibidores no tienen efecto ninguno sobre la muerte inducida por la DAO en los modelos celulares de páncreas y colon. (Fig.21)

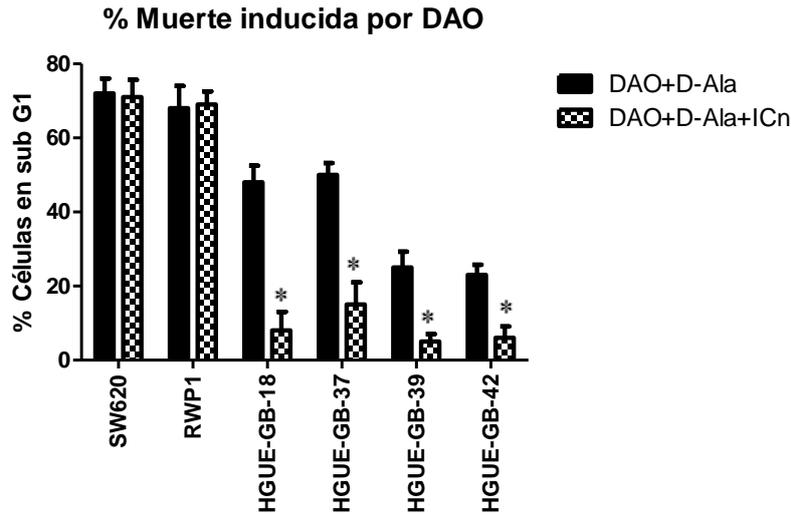
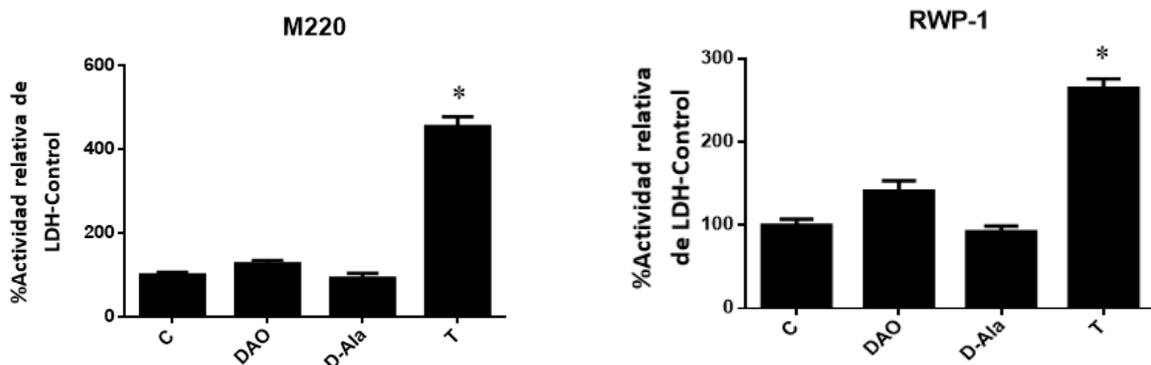


Figura 21. Estudio del porcentaje de células en la fase sub-G₁ del ciclo celular de las líneas celulares de carcinoma de colon (SW620), carcinoma de páncreas exocrino (RWP1) y cultivos primarios de glioblastoma (HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42), tratadas con DAO y D-Alanina y DAO y D-Alanina combinadas con ICn 20 μ M. Está representada la media \pm SD, con un $n \geq 3$. Test t de Student: * $p < 0.05$.

Estos resultados indicaban que la muerte celular inducida por la DAO en glioblastoma podía ser una apoptosis clásica y no una necrosis como en colon y páncreas. Para comprobar que no era, por tanto, una necrosis, analizamos si el agente intercalante en el ADN, impermeable a la membrana y fluorescente, yoduro de propidio, era capaz de penetrar en la célula y marcar el núcleo tras el tratamiento con la DAO y la D-Ala, tal y como lo hizo en el caso de las líneas celulares de carcinoma de páncreas y colon consecuencia de un daño en la membrana celular. El resultado mostró que el yoduro de propidio no era capaz de penetrar en el interior de la célula

Lo demostrado con el yoduro de propidio decidimos apoyarlo realizando un ensayo colorimétrico que se utiliza para medir la permeabilidad de la membrana de las células. En dicho ensayo se midieron los niveles de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa que se encuentra en principio en el interior de las células, pero cuando la membrana se ve dañada es liberada al medio. Como resultado de este ensayo se vio que no se producía liberación de LDH tal y como se muestra en la figura, probando que en glioblastoma no hay necrosis y sí probablemente una apoptosis clásica. (Fig.22)



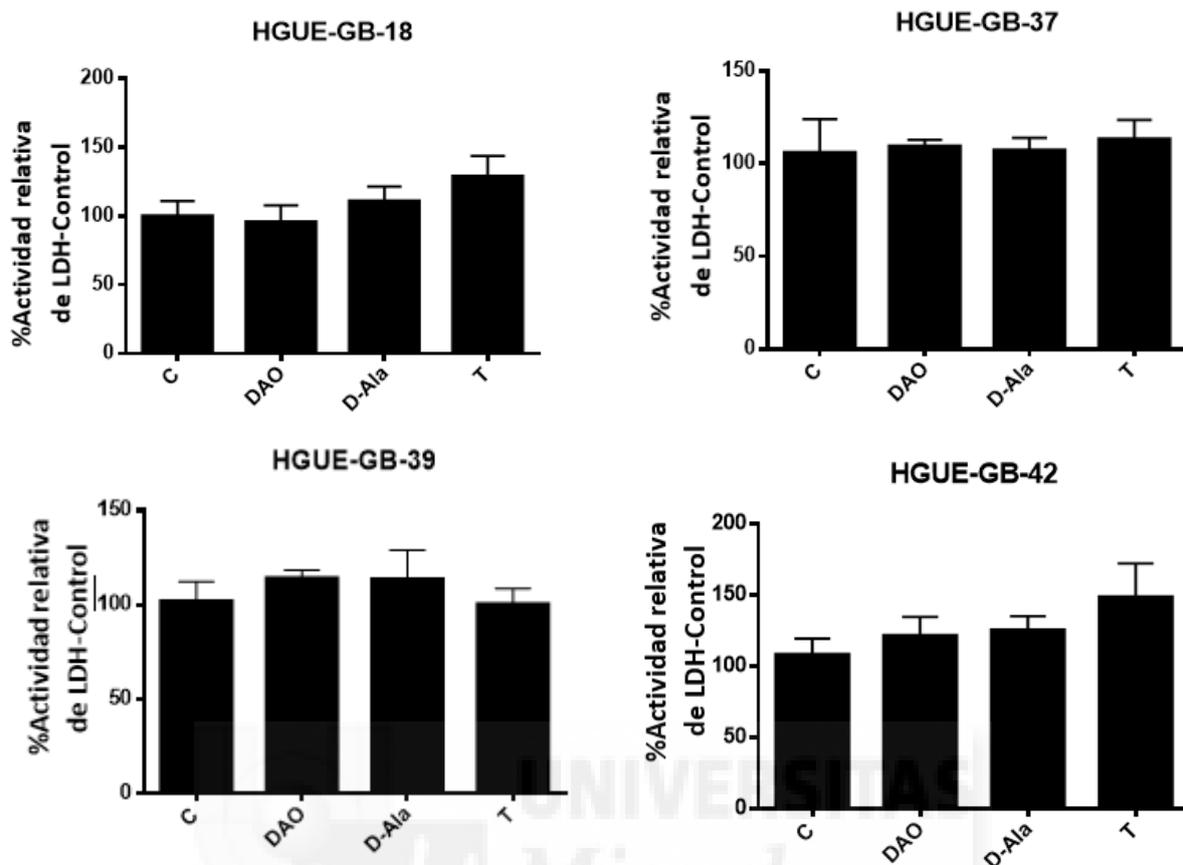


Figura 22. Estudio de la actividad de la enzima LDH en las líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino M220 y RWP-1 y en los cultivos primarios de glioblastoma HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 tratadas con DAO, D-Alanina y con ambos compuestos a la vez. Los valores representan la media \pm SD, con un $n \geq 3$. Test t de Student: * $p < 0.05$

OBJETIVO 4: Determinar si existe un efecto diferencial de inducción de muerte celular por la DAO en cultivos primarios de linfocitos aislados de muestras de sangre periférica de pacientes del Hospital General Universitario de Elche (HGUE) no oncológicos o pacientes con leucemia aguda.

El estudio de los resultados obtenidos al determinar el efecto de la DAO sobre diferentes líneas celulares de diversos tipos de neoplasias en el primer objetivo y el efecto de la DAO sobre las líneas celulares no tumorales en el segundo, nos suscitó otro interesante punto a estudiar. Nos llamó la atención que una línea de eritroleucemia humana, la K-562, fuera inducida a muerte celular por la DAO activada y que los linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes no oncológicos no lo fueran. Nos planteamos si pudiera existir un efecto diferencial sobre las células leucémicas y si este podría ser utilizado terapéuticamente. Para estudiar si era el caso, en colaboración con el Servicio de Hematología del HGUE y con el permiso del Comité Ético de Investigación Clínica del hospital (CEIC), abordamos la realización de un estudio piloto en el que pretendíamos analizar el efecto de la DAO activada sobre cultivos primarios de linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con leucemia y de pacientes no oncológicos ni infectivos del hospital.

Este estudio está mostrando ser metodológicamente difícil de realizar, puesto que existe una gran variabilidad entre los diferentes pacientes, los diferentes tipos de leucemia, los diferentes tratamientos recibidos por los pacientes y entre los diferentes métodos de estudio.

Inicialmente medimos exclusivamente viabilidad celular por el método de Trypan Blue. Nuestros resultados, tras analizar muestras de varios pacientes control y pacientes con leucemia parecían mostrar que existían diferencias entre el efecto de la DAO sobre las células leucémicas y las células no tumorales. Así pasamos a realizar un segundo análisis haciendo uso del citómetro de flujo del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), el BD FACSCanto™ II. Como se puede observar (Fig.23) el incremento del número de células muertas, y por tanto en la fase Sub-G₁ del ciclo celular, de las muestras procedentes de pacientes con leucemia linfocítica aguda respecto al control sin tratar es bastante grande en comparación con el número de células en dicha fase en el caso de las muestras procedentes de pacientes no oncológicos ni infecciosos, incremento que apenas alcanza el 2%.

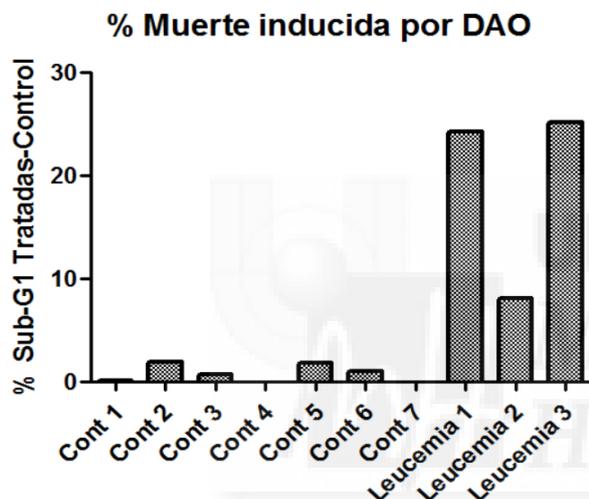


Figura 23. Análisis de la fase sub-G₁ del ciclo celular tras el tratamiento con la DAO y su sustrato, la D-Alanina, de los cultivos primarios de linfocitos aislados de muestras de sangre periférica de 7 pacientes del Hospital General Universitario de Elche no oncológicos ni infecciosos (pacientes control) y 3 pacientes con leucemia linfocítica aguda.

A pesar de estos resultados favorables consideramos que el equipo de citometría utilizado nos mostraba mucha variabilidad entre paciente y paciente y no era capaz de diferenciar adecuadamente entre los diferentes tipos celulares presentes en la muestra. Por tanto, un incremento de la fase sub-G₁ sólo nos indicaba que había muerte, pero no podíamos afirmar con seguridad que fueran los blastos aquellos que contribuían a ese incremento. En colaboración con el Servicio de Hematología del HGUE y utilizando su citómetro de flujo, Beckman Coulter Navios, se ha empezado un proyecto piloto destinado a estudiar el efecto de la DAO activada sobre las poblaciones celulares de las muestras de los distintos pacientes marcando con anticuerpos para diferentes antígenos: CD13-FITC, CD14-PE, CD33-APC y CD117-PC5.5, cuatro marcadores de linaje, CD34-PC7 y CD45-KrO, dos marcadores de madurez y CD15-PB que es un marcador para sub-clasificar el tipo de leucemia. Nosotros nos centramos sobre todo en CD117 y CD34 ya que eran los que nos interesaban por estar mayoritariamente presentes en los blastos, a los cuales dirigimos el tratamiento, aunque nos fijábamos también en los niveles de monocitos y leucocitos granulares para saber si les afectábamos colateralmente.

Por el momento hemos analizado varios controles no tumorales y seis leucemias de diverso origen. Los resultados obtenidos que se muestran en la figura (Fig.24) reflejan una disminución respecto al control de los blastos que

expresan CD34 y CD117 en tres de las leucemias y prácticamente ningún cambio en las otras tres.

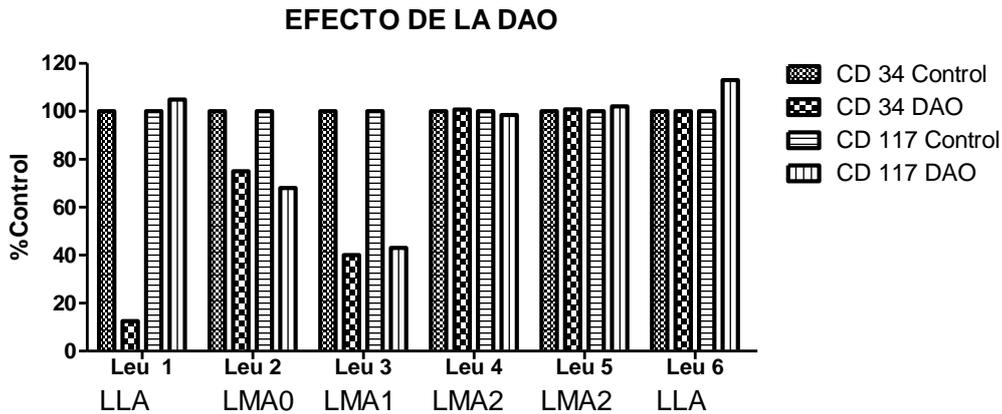


Figura 24. Análisis por citometría de flujo de cultivos primarios de linfocitos aislados de sangre periférica de 6 pacientes con leucemia aguda del HGUE. Se muestra el tipo de leucemia aguda que presenta cada uno de ellos, LLA (Leucemia Linfóide Aguda), LMA0 (Leucemia Mieloide Aguda sin diferenciación localizada), LMA1 (Leucemia Mieloide Aguda sin maduración) o LMA2 (Leucemia Mieloide Aguda con maduración). Se representa el número de blastos que expresan CD34 y CD117 de las muestras tratadas con DAO y D-Alanina respecto al control.

Por otra parte, los monocitos y leucocitos granulares se han mantenido intactos, lo cual quiere decir que, al parecer, la acción de la DAO es determinante únicamente en los blastos (Fig.25).

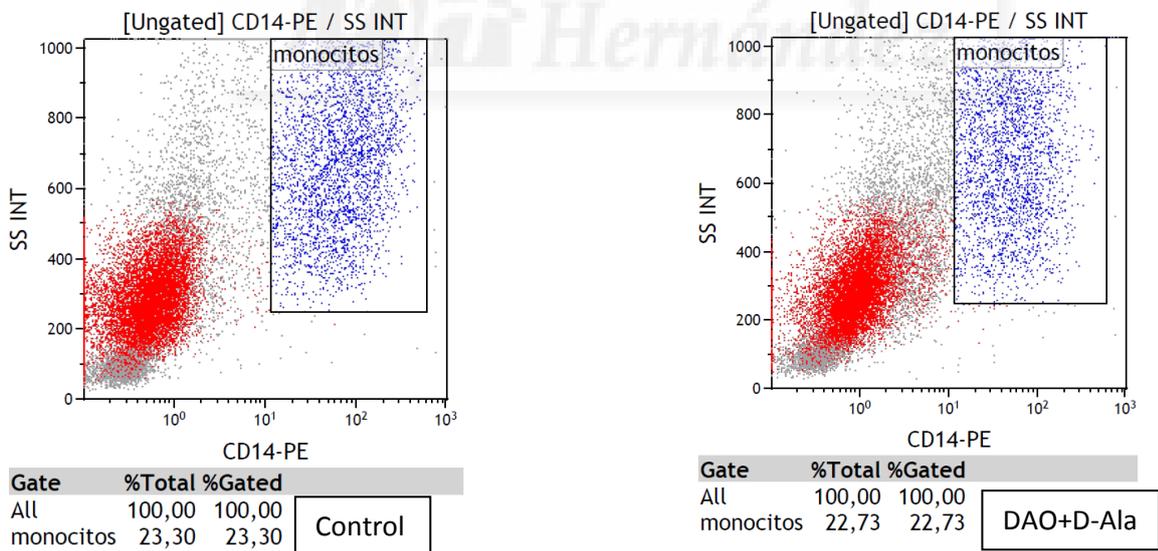


Figura 25. Análisis por citometría de flujo de cultivos primarios de linfocitos aislados de sangre periférica de uno de los pacientes con leucemia aguda del HGUE. Se representa el número de monocitos de la muestra sin tratar y de la tratada con DAO y D-Alanina.

Los efectos diferenciales de la DAO pueden deberse al subtipo exacto de leucemia, el tipo y número de mutaciones que estén presentes en los distintos pacientes, los tratamientos previos recibidos por los pacientes, la progresión

de la enfermedad etc.

Harían falta más muestras para poder sacar conclusiones, pero, de momento, en nuestro caso hemos obtenido efectos favorables en los pacientes que presentan leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielocítica aguda sin diferenciación localizada (LMA 0) y leucemia mielocítica aguda sin maduración (LMA 1). Sin embargo, nuestro tratamiento no ha tenido un efecto significativo sobre las muestras de los pacientes con leucemia mielocítica aguda con maduración (LMA 2). En el caso de la “leucemia 6”, no ha tenido efecto el tratamiento ya que el paciente estaba en un estado terminal y multirresistente después de los diversos tratamientos recibidos, lo cual ha podido contribuir a que, aunque se trate de una leucemia linfocítica aguda (LLA) como la “leucemia 1” y las 3 leucemias analizadas en el IBMC, no se haya obtenido el resultado esperado. Por tanto, el subtipo de leucemia es determinante a la hora de esperar unos resultados u otros de nuestro tratamiento.

También quisimos saber si la DAO, junto a la D-Alanina, puede tener efecto en los linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes sanos fijándonos en los monocitos y leucocitos granulares para saber si sufrían daños colaterales. No hubo diferencias respecto al control de cada paciente, al igual que ocurrió en los pacientes con leucemia, por lo que concluimos que no parece haber efecto sobre otras células que no sean blastos en las muestras tratadas.

OBJETIVO 5: Determinar si las vías de transducción de señales mediadas por las PKCs clásicas y la vía de NF- κ B pueden modular los efectos de la DAO en células hematopoyéticas.

La variabilidad que estábamos encontrando entre los pacientes nos sugirió que podían existir mecanismos de resistencia a los efectos de la DAO que pudieran explicar esta variabilidad observada.

El análisis por citometría de flujo en el HGUE nos mostró en este sentido que algunas de las muestras de pacientes con leucemia presentaban una resistencia al efecto de la DAO. En base a esta variabilidad y a los resultados que encontrábamos decidimos incluir un objetivo para tratar de determinar mediante qué mecanismos se producía esa resistencia a los efectos de la DAO. Nuestro laboratorio ha estudiado diferentes tratamientos para enfermedades neoplásicas resistentes a los tratamientos clásicos. Dentro de estos estudios anteriores se trabajó intensamente en la utilización de terapias epigenéticas con inhibidores de desacetilasas de histonas en modelos hematopoyéticos de leucemias murinas y humanas. En estos estudios se observó y publicó [46] una relación directa de la expresión de las proteínas quinasas C clásicas, y especialmente la PKC alfa, con la resistencia al inhibidor de desacetilasas de histonas TSA. El efecto sobre la resistencia a TSA mediado por las PKCs parecía relacionado con el efecto de estas quinasas sobre el factor de transcripción NF- κ B. Dado el limitado periodo de tiempo que abarca un TFG decidimos testar si las PKCs y el NF- κ B podían jugar algún papel en la sensibilidad y/o resistencia a la DAO en nuestras muestras de leucemia. En este apartado, se evaluarán, por tanto, las vías de transducción de señales mediadas por las PKCs clásicas y la vía de NF- κ B.

Participación de la ruta de transducción de señales de las PKCs clásicas y de la vía de NF- κ B.

En primer lugar, se utilizó el compuesto 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) que es un activador de las PKCs clásicas a tiempos cortos de incubación induciendo su translocación al núcleo, pero cuyo efecto cambia

cuando se aplica sobre las células durante un tiempo prolongado, generando entonces la depleción de las PKCs y, por tanto, su pérdida de actividad, lo cual conlleva una inhibición de la proliferación, bloqueo del ciclo celular, potenciación de la diferenciación y apoptosis acelerada. En nuestros experimentos hemos testado el efecto de la depleción de las PKCs tras un tratamiento largo con TPA 1 μ M (24h).

Se realizó un ensayo por citometría de flujo en el que se comparó el efecto de las células tratadas con DAO y D-Alanina con el efecto al inhibir la ruta de transducción de las PKCs con el compuesto TPA (utilizado 24 horas antes de tratar con la DAO) y con la combinación de ambos factores. En los resultados se observan efectos muy variables (Fig.26), en la primera leucemia la DAO activada disminuye el número de blastos que expresan CD34 mucho más que con el TPA y que el TPA solo, pero al combinar la DAO con el TPA se consigue una disminución de los blastos que expresan CD117 mayor que con los dos tratamientos por separado. En la segunda leucemia disminuye más el número de blastos CD117+ el TPA y el número de blastos CD34+ la DAO activada. Por último, en la tercera leucemia disminuye más el número de blastos CD34+ y CD117+ la combinación de la DAO activada junto con el TPA. Por otra parte, no se han obtenido resultados significativos en el caso de las leucemias mieloides agudas con maduración (LMA 2), y tampoco se ha conseguido sensibilizar la muestra de la “leucemia 6” que era una leucemia linfocítica aguda terminal (LLA) y multirresistente. Por tanto, no se pueden sacar conclusiones acerca de esta vía y hacen falta muchos más experimentos y muchas más muestras. Aun así se atisba que las PKCs clásicas pueden ser importantes para la sensibilidad y/o resistencia de algunos tipos de leucemias a los efectos de la DAO.

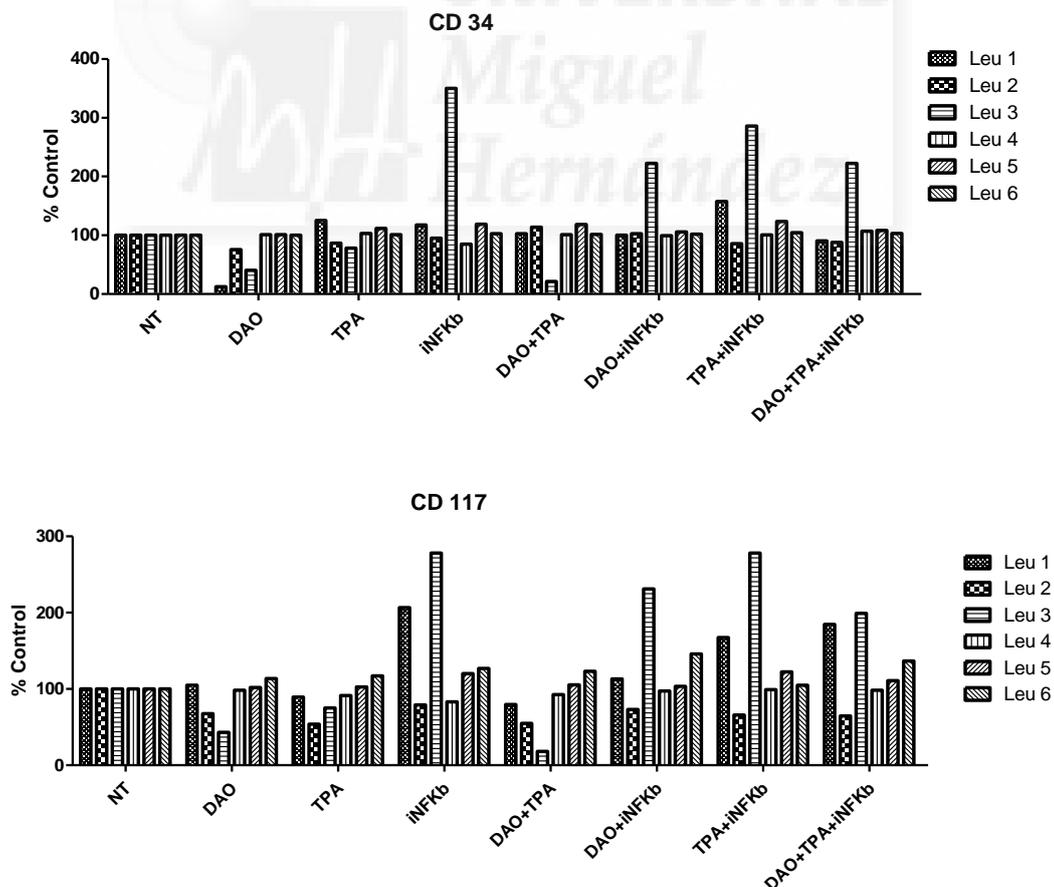


Figura 26. Análisis por citometría de flujo de cultivos primarios de linfocitos aislados de sangre periférica de 6 pacientes con leucemia aguda del HGUE. La “leucemia 1” y la “leucemia 6” son LLAs, la “leucemia 2”

una LMA0, la “leucemia 3” una LMA1 y la “leucemia 4” y la “leucemia 5” unas LMAs2. Se representa el porcentaje de blastos que expresan CD34 y CD117 de las muestras tratadas con respecto al control. Los tratamientos son DAO y D-Ala, así como TPA 1 μ M (24h) e iNF- κ B 5 μ M como controles y DAO activada con D-Ala y combinada a su vez con TPA 1 μ M (24h) y con iNF- κ B 5 μ M.

Posteriormente probamos a inhibir el NF- κ B para conocer si su ruta está directamente relacionada con el efecto de la DAO o la resistencia a este. El NF- κ B es un factor de transcripción regulado mediante el enmascaramiento de su señal de localización nuclear por las proteínas de la familia I κ B, de modo que para llevar a cabo su acción necesita dirigirse al núcleo tras la inhibición y degradación de las I κ B. El inhibidor de NF- κ B por tanto impide su migración al núcleo y su acción sobre el ADN, así se consigue, en teoría, una anulación de la supervivencia y proliferación incontrolada de la célula.

Se realizó un ensayo similar al anterior, por citometría de flujo, en el que se comparó el efecto de las células tratadas con DAO y D-Alanina, con el del inhibidor de NF- κ B y con la combinación de ambos. Como se puede observar (Fig.26) los resultados con el inhibidor de NF- κ B también son muy variables, incluso en algunas de las muestras, sobre todo en la tercera, aumenta el número de blastos que expresan CD34 y CD117. Al igual que con la depleción de las PKCs por TPA, son necesarias más muestras y datos para poder afirmar el papel de la vía de NF- κ B en la actividad de la DAO en muestras de sangre periférica de pacientes oncológicos.

A pesar de ello, podemos afirmar que no vamos desencaminados y que en distintos tipos de leucemia aguda tanto las PKCs como el NF- κ B juegan un papel importante, así como también en el efecto de la DAO activada sobre los blastos de estas leucemias.

Por otra parte también tuvimos en cuenta cómo se veían afectados los monocitos y los leucocitos granulares en los pacientes con leucemia aguda cuando se trataban con TPA (24h) y/o con iNF- κ B en combinación o no con la DAO y su sustrato. Lo que ocurre es que en estos pacientes disminuyen los monocitos tanto con el TPA (24h), como con el iNF- κ B, como con la combinación de éstos con la DAO y la D-Alanina.

En cuanto a los controles sanos hemos observado que, al igual que en las muestras de los pacientes con leucemia aguda, no se ven afectadas las células sanas con la DAO activada, pero la depleción de PKCs por TPA disminuye el número de monocitos, aunque menos cuando se combina con la DAO. En el caso del iNF- κ B aumenta el número de monocitos, lo cual supone un problema mayor pero dicho aumento disminuye cuando se combina con la DAO.

En conclusión, se aprecia la necesidad de tener más muestras para poder, primero determinar sobre que tipos de leucemia aguda se pueden obtener efectos con la DAO, y segundo, concentrar el estudio sobre este tipo de leucemias para determinar el valor terapéutico real del tratamiento enzimático.

5 DISCUSIÓN

Actualmente se ha incrementado la necesidad de encontrar terapias alternativas para el tratamiento del cáncer de forma eficaz y sobre todo segura, debido al grave problema sanitario que representa dicha enfermedad mundialmente y a los inconvenientes que presentan las terapias comúnmente utilizadas, como la quimioterapia y la radioterapia. Entre los principales problemas que suelen surgir con estos tratamientos destacan la aparición de resistencias y efectos secundarios al tratamiento.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la enzima D-aminoácido oxidasa de *R.gracilis* como posible terapia enzimática frente al cáncer o como posible potenciación de las actuales terapias. Dicha enzima afecta a la supervivencia celular mediante la producción de radicales libres causada por la desaminación oxidativa de su sustrato, un D-aminoácido, en nuestro caso la D-Alanina.

El primer paso ha sido determinar los efectos que tiene esta enzima sobre diferentes líneas celulares tumorales de diverso origen para saber si los resultados anteriormente obtenidos en nuestro laboratorio en cáncer de colon y en otros laboratorios [47][48] eran extrapolables a otros tipos de cáncer. Para ello se han realizado ensayos de viabilidad celular tratando, con DAO y D-Alanina, las líneas celulares LN-229 de glioblastoma, SH-SY5Y de neuroblastoma, RWP-1 de carcinoma de páncreas exocrino y K-562 de eritroleucemia humana en las cuales la DAO tuvo un efecto citotóxico mayor o menor dependiendo de la sensibilidad de cada línea celular a la enzima. Sin embargo, al probar en una línea celular de cáncer de mama, JIMT-1, la DAO tuvo efecto citostático con bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular sin aparente muerte celular en las primeras 24h después del tratamiento.

Se realizó también un ensayo de MTT en las diferentes líneas celulares aprovechando estudios en nuestro laboratorio sobre la inmovilización de la enzima en nanopartículas magnéticas, pudiendo entonces comprobar que la DAO inmovilizada tenía un efecto superior al producido de manera libre, como sucedía en las líneas celulares de carcinoma de colon, previamente estudiadas en nuestro laboratorio. En este trabajo se continuó trabajando con la DAO libre por motivos económicos, de disponibilidad y porque a la dosis utilizada de 2 u/ml apenas se aprecian diferencias en el efecto total.

Tras haber demostrado que, efectivamente, el efecto de la DAO en colon era extrapolable a las líneas celulares tumorales sometidas a estudio se decidió determinar si el efecto tóxico de la enzima afectaba a todo tipo de células, es decir, si tenía el mismo efecto sobre líneas celulares tumorales que sobre líneas celulares no tumorales. Para ello se estudió el ciclo celular de linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes no oncológicos ni infectivos del Hospital General Universitario de Elche (HGUE), tras tratar con la DAO y la D-Alanina, el cual se mantuvo aparentemente estable. A continuación, se decidió confirmar el hecho de que no se vieran afectadas las células sanas con 3 líneas celulares más, dos de fibroblastos, 1BR3G e IMR90 y una de células pancreáticas humanas, la HPDE, obteniendo baja toxicidad en dos de ellas y un efecto tóxico en IMR90 significativo pero menor que el observado en las células tumorales. También se determinó la toxicidad, con los mismos resultados, en adipocitos de rata, donde llama la atención que la DAO no afecte a la viabilidad celular pero disminuya el tamaño de los acúmulos de grasa de estas células. Por tanto, la DAO junto con su sustrato presenta un efecto selectivo mayoritario sobre las células tumorales, hecho de especial trascendencia para el posible uso de esta terapia in vivo.

Por otra parte, ya se conocía, por trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio, que el mecanismo de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO en carcinoma de colon y páncreas exocrino era un tipo de necrosis. En este trabajo también se quiso averiguar si era similar en las células de glioblastoma, ya que en este caso la DAO tiene un efecto más leve. Para ello se analizó el ciclo celular de diferentes cultivos primarios de glioblastoma (HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42) tras tratar con DAO, D-Alanina e inhibidores de distintos tipos de muerte celular llegando a la conclusión de que se trataba de una apoptosis clásica por el efecto de inhibición de muerte conseguido con inhibidores de caspasas. Para corroborarlo se comprobó que el yoduro de propidio no era capaz de penetrar en el interior celular y que no había liberación de lactato deshidrogenasa, por tanto, se podía descartar que se diera una necrosis en células de glioblastoma tras el tratamiento con la DAO, siendo posible que se diera una apoptosis clásica.

Finalmente, en base a nuestros resultados iniciales que mostraban que los linfocitos no tumorales no se veían afectados por la DAO, en tanto que la DAO producía muerte celular en una línea celular de eritroleucemia humana (K-562), nos parecía especialmente interesante determinar si existía un efecto diferencial de muerte celular inducida por la DAO en células leucémicas, lo que podría abrir la posibilidad de desarrollar, incluso, tratamientos extracorpóreos basados en esta terapia enzimática. Se abordó por tanto la realización de un estudio piloto en colaboración con el Hospital General Universitario de Elche (HGUE) en el que se quiso analizar el efecto de la DAO activada sobre cultivos primarios de linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con leucemia y de pacientes no oncológicos ni infectivos. Este estudio piloto en su totalidad, no era posible abarcarlo en el periodo de investigación correspondiente a un TFG, porque intervenían demasiadas variables, como era el tipo de leucemia, efecto del tratamiento sobre los blastos, efecto del tratamiento sobre otras poblaciones celulares, tratamientos distintos de la DAO recibidos o no por el paciente etc. Por eso los objetivos de este estudio en lo referente al TFG, se han centrado en responder a preguntas sencillas destinadas a orientar el estudio en el futuro. Estas preguntas han sido:

1. Dado que las eritroleucemias son raras. ¿Podría el tratamiento con la DAO ser utilizado en otro tipo de leucemias más frecuentes, y especialmente en leucemias agudas?
2. ¿Depende el efecto de la DAO sobre las leucemias agudas del tipo de leucemia aguda que se trate?
3. ¿Se ve afectado el tratamiento con la DAO por tratamientos previos del paciente con otros fármacos y por la existencia de resistencia a los mismos?

Como resultados preliminares se ha obtenido en algunos tipos de leucemias agudas una disminución selectiva de blastos que expresan CD34 y CD117 y una ausencia de efecto tóxico sobre los monocitos y leucocitos granulares, apoyando la anterior hipótesis de la selectividad de la DAO hacia las células tumorales. Para poder sacar conclusiones hacen falta más muestras, pero de momento podemos afirmar que la DAO ha tenido efecto en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA), excepto en el caso terminal y multirresistente, leucemia mieloide aguda sin diferenciación localizada (LMA 0) y leucemia mieloide aguda sin maduración (LMA 1) pero no en los pacientes con leucemia mieloide aguda con maduración (LMA 2).

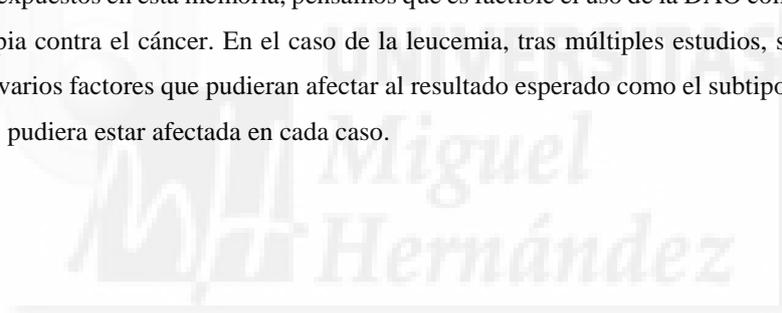
Estos resultados nos han llevado a redefinir el estudio en cuanto a los criterios para incluir pacientes o no en el mismo. En el futuro nos centraremos en los pacientes de LLA Y LMA estadios 0 y 1. También los resultados nos hacen pensar que quizá es mejor realizar el cultivo primario y la determinación del efecto de la DAO en la muestra de la punción inicial que se realiza a los pacientes para diagnosticar la enfermedad que en la sangre periférica

obtenida en los controles rutinarios, en los que los pacientes pueden estar bajo el efecto de otros tratamientos que enmascaren los efectos de la DAO.

Al obtener estos resultados quisimos basados en estudios previos realizados por el grupo [46] sobre líneas celulares leucémicas hacer una determinación rápida acorde a la duración de un TFG de posibles vías de transducción de señales que pudieran estar mediando la falta de efecto de la DAO en algunas de nuestras muestras leucémicas.

Decidimos utilizar el TPA y específicamente su efecto a largo plazo de depleción de PKC clásicas. Nosotros habíamos publicado que la activación de estas quinasas por TPA inducía resistencia a tratamientos epigenéticos con TSA. Pensamos que si este tipo de resistencia mediado por PKCs participaba de algún modo en la resistencia a la DAO, si deplecionábamos las PKCs clásicas con un tratamiento largo con TPA, observaríamos una sensibilización al efecto de la DAO de las leucemias resistentes. Igualmente se pensó que podría suceder inhibiendo la vía de NF- κ B, un factor de transcripción que ha sido relacionado en multitud de modelos celulares con la supervivencia celular e incluso en otros modelos hematopoyéticos como los linfomas [49]. No hemos podido sacar conclusiones certeras por el limitado número de muestras sometidas a estudio pero podemos concluir que las vías de transducción de señales mediadas por las PKCs clásicas y la vía de NF- κ B son importantes en ciertos casos de leucemia y en el efecto de la DAO sobre dichos casos.

Por todos los datos expuestos en esta memoria, pensamos que es factible el uso de la DAO como terapia enzimática o apoyo a una terapia contra el cáncer. En el caso de la leucemia, tras múltiples estudios, se podría administrar teniendo en cuenta varios factores que pudieran afectar al resultado esperado como el subtipo de leucemia o la vía de señalización que pudiera estar afectada en cada caso.



6 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

A lo largo del trabajo se han corroborado los efectos producidos por la DAO sobre diferentes líneas celulares tumorales, así como la ausencia de efecto sobre líneas celulares no tumorales y se ha estudiado el método de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO sobre las células de glioblastoma. Finalmente se ha abordado un estudio piloto junto el Hospital General Universitario de Elche para analizar la posible aplicación de la enzima como tratamiento contra la leucemia. Así, las conclusiones extraídas de este trabajo son:

1. El tratamiento con 2 U/ml de DAO y su sustrato, la D-Alanina 1 mM, genera radicales libres que afectan a la proliferación y/o viabilidad celular de células tumorales en las primeras 24 horas del tratamiento.
2. La efectividad de la enzima para inducir muerte celular en líneas celulares de colon previamente descrita en nuestro laboratorio es extrapolable en líneas celulares de glioblastoma, neuroblastoma, carcinoma de páncreas exocrino y eritroleucemia humana.
3. El efecto de la DAO sobre estas líneas celulares es mayoritariamente un efecto citotóxico tal y como se puede observar por el aumento en la fase sub-G₁ del ciclo celular tras el tratamiento.
4. En algunos casos como en la línea celular JIMT-1 de cáncer de mama el efecto de la DAO es fundamentalmente citostático produciendo un bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular tras el tratamiento.
5. La DAO no presenta efectos citotóxicos ni citostáticos observables en diferentes modelos celulares no tumorales tales como linfocitos, fibroblastos, células de páncreas y adipocitos. En el caso de la línea celular IMR90 la DAO produce un efecto citotóxico aunque menor que en las células tumorales.
6. El mecanismo de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO en células de glioblastoma es una apoptosis clásica en contraposición con la necrosis de tipo parthanatos producida en líneas celulares de carcinoma de páncreas y colon.
7. En el estudio piloto, abordado en colaboración con el HGUE, se observa una disminución selectiva de blastos en cultivos primarios de linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con leucemia LLA y LMA 0 y 1 tras el tratamiento con la DAO y la D-Alanina. No observándose dicho efecto en pacientes con leucemias LMA 2 y LLA multirresistentes.
8. El tratamiento con la DAO no produce efectos citotóxicos ni citostáticos sobre los monocitos y leucocitos granulares ni en el caso de los pacientes con leucemia ni en los pacientes control del HGUE.
9. La depleción de la actividad de las PKCs mediante tratamientos largos con TPA puede jugar algún papel en la sensibilidad y/o resistencia de los pacientes con leucemia a los efectos de la DAO, aunque es necesario aumentar el tamaño muestral para poder comprobarlo adecuadamente.

10. La vía de NF- κ B puede jugar algún papel en la sensibilidad y/o resistencia de los pacientes con leucemia a los efectos de la DAO, aunque es necesario aumentar el tamaño muestral para poder comprobarlo adecuadamente.

A pesar de que a lo largo del trabajo se ha demostrado el efecto de la enzima sobre la proliferación y/o viabilidad celular en varias líneas celulares tumorales y la ausencia de efecto en las células no tumorales, la posibilidad de utilizar dicha terapia in vivo debe de ser verificada con más estudios de citotoxicidad, distribución en el organismo, eliminación etc. También sería necesario aumentar el número de líneas celulares de cada tipo de cáncer, así como los tipos de cáncer sometidos a estudio, con el propósito final de validar el tratamiento analizado en este trabajo y su posible utilización como terapia enzimática contra el cáncer.

Además, también se trabajará en indagar más en la inmovilización enzimática puesto que esta incrementa el efecto de la DAO.

Por otra parte, sería interesante averiguar que es lo que ocurre en los adipocitos exactamente ya que se ha observado una ausencia de efecto tóxico y una disminución de grasa en estos lo cual puede ser importante en otras investigaciones en otros tipos de enfermedades.

También hemos llegado a la conclusión de que en las células de glioblastoma el método de inducción de muerte celular llevado a cabo por la DAO es una apoptosis clásica pero haría falta realizar más experimentos con muchos más inhibidores para poder confirmarlo por completo.

Con respecto al proyecto piloto comenzado en el HGUE con cultivos primarios de linfocitos aislados de muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia y pacientes no oncológicos ni infectivos es necesario incrementar el número de muestras para poder sacar conclusiones certeras y poder analizar la posibilidad de utilizar esta terapia más adelante en ciertos tipos de leucemia. Así queda pendiente, averiguar si es cierto que la DAO sólo tiene efectos determinantes sobre los blastos en las leucemias linfoides agudas (LLA), mieloides agudas sin diferenciación localizada (LMA 0) y mieloides agudas sin maduración (LMA 1) y el papel de las vías de transducción de señales mediadas por las PKCs clásicas y la vía de NF- κ B en el efecto final conseguido con la DAO y su sustrato, la D-Alanina.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. "Defining Cancer". National Cancer Institute. Retrieved 10 June 2014.
2. Karin E. de Visser, Alexandra Eichten, Lisa M. Coussens (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer* 6, 24-37.
3. SEOM. Sociedad Española de Oncología Médica (2017). Las cifras del cáncer en España.
4. Rodríguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. (2007) Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol.* 18, i3-i8.
5. Vardiman JW (2010) The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions* 184, 16-20.
6. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA (2004) Acute Myeloid Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 98-117.
7. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM (2005) Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 106, 1154-1163.
8. Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM (2006) Adult Acute Myeloid Leukemia. *Mayo Clin Proc.* 81, 247-260.
9. Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM (2005) Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc.* 80, 1517-1527.
10. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM (2003) The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer* 98, 1337-1354.
11. Cortes J (2001) Central nervous system involvement in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 15, 145-162.
12. Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., Forman, D. (2012) Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 13, 790-801.
13. Fang J, Nakamura H, Iyer AK (2007) Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* 15, 475-486.
14. 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.
15. "Targeted Cancer Therapies". National cancer institute. Reviewed 14 August 2017.
16. Greco O, Dachs GU (2001) Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J Cell Physiol* 187, 22-36.
17. Davies KJ (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61, 1-31.
18. Schüth F, Lu AH, Salabas EL (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46, 1222-1244.
19. Beckman KB, Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272, 19633-19636.

20. Berlett BS, Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313–20316.
21. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26, 239-257.
22. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.
23. Novosad J, Holická M, Novosadová M, et al. (2011) Cell death and its role in immunopathogenesis of infectious diseases. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 17(3):76-80.
24. Labbe K, Saleh M (2008) Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* 15(9):1339-49.
25. Kroemer G, Galluzzi L, et al.(2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 16(1):3-11.
26. Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8(6):569-81.
27. Dunai Z, Bauer PI, Mihailk R (2011) Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathol. Oncol. Res.* 17(4):791-800.
28. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, et al. (2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 18(11):1272-82.
29. He S, Wang L, Miao L, et al. (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell.* 137(6):1100-11.
30. Linkermann A, Brasen JH, Himmerkus N, et al. (2012) Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 81(8):751-61.
31. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, et al. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1(2):112-119.
32. Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenbark GR (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 36-40.
33. Newton AC (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270:28495-28498.
34. Jaken S (1996) Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 8:168-173.
35. Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Gaya CV, Moscat J (1999) Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2180-2188.
36. Peters RT, Liao SM, Maniatis T (2000) IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol. Cell*, 5, 513-522.
37. Aihara H, Asaoka Y, Yoshida K, Nishizuka Y (1991) Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc. Natl Acad. Sce. USA*, 88, 11062-11066.
38. Sun SC, Chang JH, Jin J (2013) Regulation of nuclear factor-kappaB in autoimmunity. *Trends Immunol* 34:282–9.

39. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M (2012) NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* 246:379–400.
40. Sun SC (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 21: 71–85.
41. 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.
42. 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.
43. Pollegioni L, Sacchi S, Caldinelli L, et al. (2007) Engineering the properties of d-amino acid oxidases by a rational and a directed evolution approach. *Curr Protein Pept Sci* 8, 600–618.
44. Bello D (2013) Desarrollo de sistemas para la inmovilización de proteínas y sus aplicaciones biotecnológicas. Tesis Doctoral, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández de Elche, España.
45. Fuentes-Baile M (2013) Iniciación a la inmovilización de proteínas y su utilización como terapia enzimática en cáncer. Realización de pruebas de concepto en líneas celulares de diferentes tipos de tumores. Trabajo de Fin de Grado, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández de Elche, España.
46. Castro-Galache, M. D., et al., (2007) Protein kinase C-alpha antagonizes apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors in multidrug resistant leukaemia cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39, 1877-1885.
47. Jun Fang, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, Hiroshi Maeda (2002) Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-Amino Acid Oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer research* 62, 3138-3143.
48. Jun Fang, Dawei Deng, Hideaki Nakamura et al. (2008) Oxystress inducing antitumor therapeutics via tumor-targeted delivery of PEG-conjugated D-Amino Acid Oxidase. *Int. J. Cancer* 122, 1135-1144.
49. S V Muralidharan, J Bhadury, L M Nilsson, et al. (2016) BET bromodomain inhibitors synergize with ATR inhibitors to induce DNA damage, apoptosis, senescence-associated secretory pathway and ER stress in Myc-induced lymphoma cells. *Oncogene* 35, 4689-4697.