



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Modulación epigenética en el tratamiento personalizado del glioblastoma

Memoria de Trabajo Fin de Grado

San Juan de Alicante

Junio 2024

Autora: **Jennifer Melero Gea**

Modalidad: Experimental

Tutores: Luis Miguel Valor Becerra y Francisco Navarrete Rueda

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
Palabras clave	1
ABSTRACT.....	2
Keywords.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Glioblastoma	3
1.1.1. Definición y clasificación.....	3
1.1.2. Epidemiología y esperanza de vida	3
1.1.3. Diagnóstico y Sintomatología.....	3
1.1.4. Tratamiento	4
1.2. Epigenética.....	4
1.2.1. Generalidades	4
1.2.2. Epigenética en el desarrollo y tratamiento del glioblastoma	5
1.3. Justificación del estudio.....	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Lugar y tiempo del estudio.....	8
3.2. Líneas celulares de glioblastoma.....	8
3.2.1. Descongelación de las células y puesta en marcha de los cultivos.....	8
3.2.2. Mantenimiento de los cultivos	9
3.3. Tratamiento farmacológico	11
3.4. Medida de la viabilidad celular.....	14
3.5. Imágenes de contraste de fase.....	16
3.6. Declaración ética.....	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Las líneas celulares de glioblastoma muestran diferentes perfiles de sensibilidad farmacológica	17
4.2. Las sensibilidades farmacológicas son dependientes de la concentración ..	19
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

Introducción: El glioblastoma es el tumor maligno del sistema nervioso central más común y con peor pronóstico. A pesar del tratamiento con Temozolomida la supervivencia es muy baja y las recidivas ocurren en la mayoría de los casos. La epigenética permite comprender la tumorigénesis y predecir la respuesta al tratamiento oncológico, así como constituir dianas terapéuticas.

Objetivos: Los objetivos del estudio son definir el patrón de resistencia/sensibilidad en base a viabilidad celular para cada cultivo procedente de pacientes frente a un panel de fármacos con efectos a nivel epigenético y validar el efecto de los fármacos más prometedores mediante una curva dosis-respuesta.

Metodología: Se trata de un estudio experimental realizado en cultivos procedentes de pacientes diagnosticados de glioblastoma en el que se estudia la acción de los fármacos incluidos en el panel Tocriscreen Epigenetics Library (número de catálogo 6801) midiendo la viabilidad celular con el reactivo AlamarBlue HS.

Resultados: Se estudia la acción del panel de fármacos obteniendo diferentes perfiles de sensibilidad farmacológica para cada línea celular de glioblastoma y destacando la acción de hidrocloreuro de hesperadina y ryuidina. Posteriormente se valoran estos compuestos mediante curvas dosis-respuesta demostrando que las sensibilidades farmacológicas son dependientes de la concentración. También se valoran los cambios morfológicos apreciando diferencias considerables a medida que aumenta la concentración.

Conclusiones: Cada línea celular responde de manera diferente a los moduladores epigenéticos por lo que el tratamiento personalizado puede ser una opción terapéutica esperanzadora. Además, hidrocloreuro de hesperadina parece ser una de las opciones más interesantes.

Palabras clave: glioblastoma, epigenética, cultivo celular, tratamiento.

ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma is the most common malignant tumour of the central nervous system with the worst prognosis. Despite treatment with Temozolomide, survival is very low and recurrences occur in most cases. Epigenetics allows understanding tumorigenesis and predicting response to oncological treatment, as well as constituting therapeutic targets.

Objectives: The objectives of the study are to define the pattern of resistance/sensitivity based on cell viability for each culture from patients against a panel of drugs with effects at the epigenetic level and to validate the effect of the most promising drugs by a dose-response curve.

Methodology: This is an experimental study performed on cultures from patients diagnosed with glioblastoma in which the action of the drugs included in the Tocriscreen Epigenetics Library panel (catalog number 6801) is studied by measuring cell viability with the AlamarBlue HS reagent.

Results: The action of the panel of drugs was studied obtaining different pharmacological sensitivity profiles for each glioblastoma cell line and highlighting the action of hesperadin hydrochloride and ryuvidine. Subsequently, these compounds are evaluated by means of dose-response curves demonstrating that pharmacological sensitivities are concentration-dependent. Morphological changes are also assessed appreciating considerable differences as concentration increases.

Conclusions: Each cell line responds differently to epigenetic modulators so personalized treatment may be a hopeful therapeutic option. Moreover, hesperadin hydrochloride seems to be one of the most interesting options.

Keywords: glioblastoma, epigenetics, cell culture, treatment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glioblastoma

1.1.1. Definición y clasificación

El glioblastoma (GBM) es un tumor maligno del sistema nervioso central (SNC) que parece derivar de células troncales y progenitoras de la zona subventricular y que a nivel histológico se clasifica como glioma de grado IV y a nivel molecular como glioma wild-type para el gen *IDH1/IDH2*. Se ubica principalmente en los hemisferios del cerebro, aunque puede afectar a cualquier parte del SNC. A pesar de la terminología, la morfología de sus células difiere mucho de la de los astrocitos sanos^{1,2,3}.

1.1.2. Epidemiología y esperanza de vida

Según el Registro Central de Tumores Cerebrales de los Estados Unidos, el GBM representa el 14,5% de todos los tumores cerebrales primarios y otros tumores del SNC, el 57,7% de los gliomas y es el tumor maligno del SNC más común (48,6%). Presenta una tasa de incidencia del 3,23 por 100.000 habitantes siendo mayor en las zonas urbanas que en las rurales y 1,59 veces más común en hombres que en mujeres, siendo la edad el factor de riesgo más importante⁴.

El GBM se caracteriza por ser un tumor de rápida progresión. La mediana de supervivencia para el GBM es la más baja respecto al resto de tumores cerebrales, situándose en torno a los 15 meses tras el diagnóstico y a pesar de los tratamientos; se estima que solamente el 5% aproximadamente de los pacientes sobrevive cinco años después del diagnóstico⁵.

1.1.3. Diagnóstico y Sintomatología

El diagnóstico se realiza mediante métodos de imagen como la resonancia magnética y complementariamente la tomografía de cráneo. El GBM se caracteriza por su patrón de crecimiento en alas de mariposa. Por lo general, antes de poder diagnosticarlo el paciente ya presenta manifestaciones clínicas como consecuencia de un aumento de la presión intracraneal. Los síntomas más

típicos son: cefalea, vómitos, náuseas y alteraciones neurológicas focales como cambios de la personalidad⁶.

1.1.4. Tratamiento

El protocolo Stupp es la primera línea de tratamiento para el GBM y consiste en realizar la máxima resección quirúrgica segura del tumor, seguido de radioterapia y quimioterapia concomitante. La radioterapia consiste en irradiación focal fraccionada a una dosis de 2 grays (Gy) por fracción administrada una vez al día cinco días a la semana durante seis semanas. La quimioterapia consiste en 75 mg por m² de temozolomida (TMZ) todos los días desde que comienza hasta que termina la radioterapia. Posteriormente se realiza un descanso de cuatro semanas antes de comenzar con seis ciclos de quimioterapia, primero con 150 mg por m² de TMZ y a partir del segundo ciclo se aumenta a 200 mg por m². Los ciclos son de veintiocho días administrándose la TMZ durante cinco días por ciclo⁷.

La TMZ es un profármaco que actúa como agente alquilante citotóxico al convertirse en monometil triazeno imidazol carboxamida (MTIC) una vez se encuentra a pH fisiológico. Este compuesto basa su acción en la metilación del DNA en las posiciones O6 y N7 de la guanina. Los tumores tipo GBM, pese a ser muy heterogéneos genéticamente, a menudo presentan sistemas de reparación del DNA deteriorados por lo que suelen ser sensibles a los agentes alquilantes como la TMZ, al menos hasta que generan resistencias⁸.

En el caso de recidivas, que ocurren en en más del 90% de los casos, no hay un tratamiento farmacológico establecido claramente. Se valora individualmente para cada paciente el uso de nitrosureas, *wafers* de carmustina o reiniciar el uso de TMZ⁹.

1.2. Epigenética

1.2.1. Generalidades

La epigenética comprende los cambios del DNA que no implican alteraciones de la secuencia de nucleótidos. Modificaciones en la estructura del DNA o en la

forma en la que reacciona con otras moléculas pueden cambiar el nivel en el que los genes se activan y desactivan, regulando por tanto la estructura de la cromatina y la manera en la que se expresan los genes. Estos cambios en la función de los genes pueden ser en algunos casos hereditarios y pasar de una generación de células a otra¹⁰. La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma, compuesto por 147 pb de DNA enrollados alrededor de un octámero de histonas, que son las proteínas estructurales del núcleo celular¹¹. La compactación y compartimentalización del núcleo celular es modulable a través de mecanismos epigenéticos¹², como:

1. Modificaciones covalentes del DNA: metilación, hidroximetilación, etc.
2. Modificaciones covalentes de las histonas: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, etc.
3. Remodeladores de la cromatina dependientes de ATP: Imitation switch (ISWI), Chromodomain helicase DNA-binding (CHD), Switch/sucrose non-fermentable (SWI/SNF), INO80.
4. Intercambio de histonas por otras variantes: H3.3, H2A.Z, H2A.X, etc.
5. Algunos RNAs no codificantes: Xist, ANRIL, HOTAIR, piRNA, etc.

Los moduladores epigenéticos se pueden clasificar como *writers* (capaces de introducir modificaciones químicas en el DNA y las histonas), *readers* (capaces de identificar esas modificaciones y reclutar complejos proteicos de regulación) y *erasers* (capaces de eliminar dichas marcas)¹³.

1.2.2. Epigenética en el desarrollo y tratamiento del glioblastoma

La zona subventricular contiene células troncales neurales (NSC) que pueden transformarse en células troncales de glioma (GSC), que comparten con las anteriores la capacidad de autorrenovación y proliferación y presentan nuevas características de células tumorales como angiogénesis, invasión e inmunosupresión. Las GSC y las NSC pueden llegar a ser muy similares genéticamente, pero presentan patrones de expresión diferentes, en gran parte

debido a que las GSC presentan un bloqueo permanente que impide su diferenciación y mantiene su capacidad de autorrenovación; no obstante, pueden adaptarse rápidamente por lo que su presencia en los tumores puede explicar la capacidad de resistir a los tratamientos¹⁴.

La epigenética puede no solamente ser relevante en la tumorigénesis sino también en la respuesta al tratamiento oncológico. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor del gen de la DNA metiltransferasa de O-6-metilguanina (MGMT) puede inactivar esta enzima reparadora, lo que hace que el tratamiento con TMZ sea más efectivo¹⁵. Además, los moduladores epigenéticos pueden constituir dianas terapéuticas; en concreto, los inhibidores de histonas desacetilasas actúan como sensibilizadores frente al tratamiento actual¹⁶.

1.3. Justificación del estudio

A pesar de la terapia clínica combinada y los estudios que se han realizado a lo largo de los años sobre el tratamiento del GBM, esta enfermedad sigue teniendo un pronóstico desfavorable por lo que el estudio de nuevas alternativas terapéuticas que alarguen la supervivencia y mejoren la calidad de vida es de gran relevancia en el momento actual. Al contrario de las mutaciones somáticas, las alteraciones epigenéticas que mantienen el fenotipo tumoral pueden revertirse de manera farmacológica, por lo que su estudio puede abrir nuevas líneas de tratamiento.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis del estudio es que las células tumorales de GBM responden a diversos moduladores de la epigenética, siendo dicha respuesta susceptible de ser diferente para cada paciente, de manera que podemos definir un patrón o perfil de resistencia y sensibilidad de los fármacos empleados que es característico de cada individuo y que puede ser útil para proponer terapias personalizadas.

Para responder esta hipótesis, se realizará una prueba piloto con unos pocos casos. Por tanto, los objetivos específicos son:

- Definir el patrón de resistencia/sensibilidad en base a viabilidad celular para cada cultivo procedente de pacientes frente a un panel de fármacos con efectos a nivel epigenético;
- Validar el efecto de los fármacos más prometedores mediante una curva dosis-respuesta.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y tiempo del estudio

Se trata de un estudio experimental llevado a cabo en el Laboratorio de Investigación (Lal) del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL) durante los meses de julio y agosto de 2023.

3.2. Líneas celulares de glioblastoma

El material biológico corresponde a excedentes de diagnóstico de tejido tumoral de pacientes con glioblastoma en el Hospital General Universitario Dr. Balmis (HGUDrB). Como parte de los procedimientos del Biobanco de ISABIAL, se procedió al cultivo in vitro de este material en las dependencias del Lal para la criopreservación de células tumorales a diferentes pases para formar parte de la colección "Tumores del SNC". Para la realización del estudio, se seleccionaron tres líneas de glioblastoma: 981 (pase 7), 985 (pase 9) y 748 (pase 10) cuyo uso fue previamente autorizado (ver "[Declaración ética](#)").

3.2.1. Descongelación de las células y puesta en marcha de los cultivos

El protocolo seguido para la descongelación de cultivos celulares es el siguiente:

1. Sacar muestras del congelador y colocar en hielo.
2. Pasar los tubos con las muestras por el baño a 37 °C alrededor de 1 min dando vueltas para conseguir una descongelación homogénea.
3. Añadir las células descongeladas a un tubo falcon de 15 mL y centrifugar 5 min a 1000 rpm.
4. Retirar sobrenadante y resuspender el pellet con 10 mL de medio DMEM completo.
5. Añadir 10 mL de medio completo (ver más adelante) en un frasco T75.
6. Añadir el contenido del falcon en el frasco T75, asegurando que se extienda por toda la superficie y llevar a incubación.

3.2.2. Mantenimiento de los cultivos

El trabajo con cultivos se realiza en la Sala de Cultivos del LAI en cabina de flujo laminar vertical considerada de seguridad biológica clase dos, siguiendo en todo momento los protocolos de bioseguridad del LAI y bajo continua supervisión por personal experimentado.

Para el correcto crecimiento de las células en monocapa seguimos el procedimiento publicado previamente¹⁷. Siendo breves, utilizamos Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% suero bovino fetal (FCS) y un 1% de una solución de penicilina-estreptomicina (que lo llamaremos adelante medio completo). Los cultivos se mantienen en incubación a una temperatura (T^a) de 37°C, con dióxido de carbono (CO_2) al 5% y una humedad relativa (RH) del 95%.

Diariamente se observan los cultivos al microscopio para ver cómo se desarrollan y valorar si es necesario cambiar el medio de cultivo, realizar un pase celular o si está en condiciones de utilizarse para un experimento. Cuando un cultivo celular alcanza la confluencia, es decir, que ocupa más del 80% de la superficie del frasco es necesario realizar un pase celular, que consiste en dispersar las células a través de métodos enzimáticos para pasarlas a un nuevo frasco de cultivo.

El protocolo seguido para realizar un pase celular es el siguiente:

1. Retirar el medio de cultivo y añadir 10 mL de Tampón Fosfato Salino (PBS 1X) para lavar las células adheridas.
2. Retirar el PBS y añadir 2 mL de tripsina-EDTA al 0,01%, asegurándose de cubrir toda la superficie.
3. Meter al incubador a 37°C durante 2-3 min.
4. Sacar del incubador y dar golpes secos y fuertes al frasco para despegar las células. Comprobar al microscopio que las células se despegan.

5. Rápidamente, añadir 10 mL de medio completo para neutralizar el efecto de la tripsina. Con la misma pipeta subir y bajar el medio de cultivo para conseguir que las células se separen unas de otras.
6. Absorber todo el medio de cultivo con células y poner en un falcon de 15 mL.
7. Poner una pequeña parte en una cámara de Neubauer y realizar recuento de células. Calcular las células obtenidas y decidir cuántas sembrar, congelar o utilizar para un experimento.
8. Separar en varios tubos según el número de células necesarias y llevar a centrifugación 1000 rpm 5 min.
9. Para sembrar de nuevo, resuspender las células necesarias en medio completo y pasar a otro frasco previamente rotulado o a placas para realizar los ensayos.

Las células sobrantes que no siembren en frasco o placas se criopreservan para conservar las líneas celulares para su uso en el futuro. Para ello, las células se someten a otra centrifugación para su resuspensión en 1 mL de medio de congelación: medio completo + dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Pasar el contenido del tubo falcon a criotubos (200.000 células / criotubo) y colocar en un contenedor de congelación con isopropanol que se mantendrá a -80°C. Al día siguiente, los criotubos se devuelven al Biobanco para su preservación en nitrógeno (N) líquido.

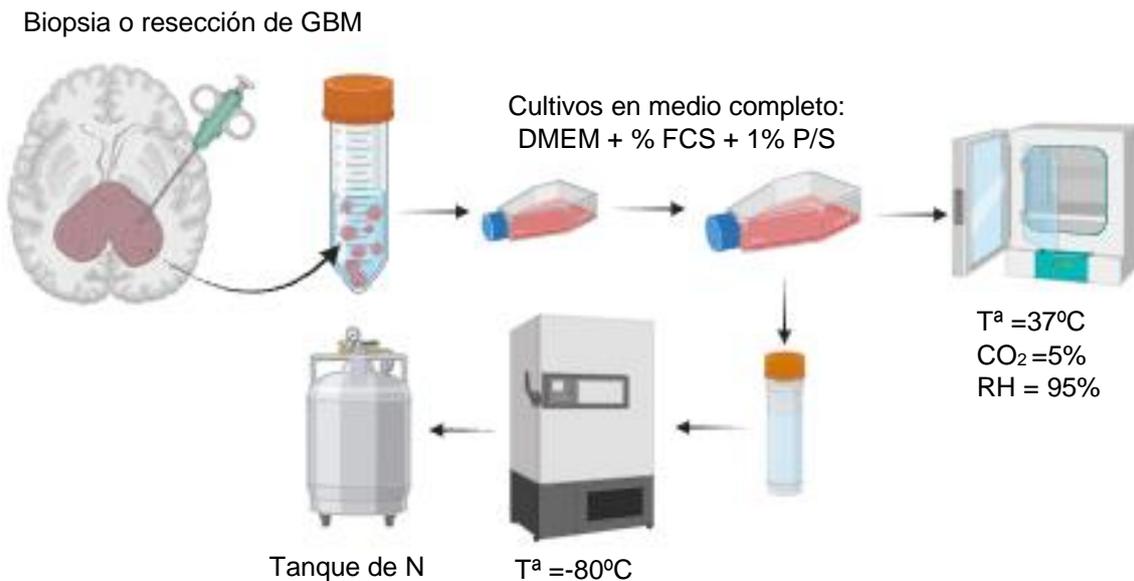


Figura 1. Resumen del proceso por el cual se obtienen y se conservan líneas celulares de glioblastoma. FCS, suero fetal bovino; P/S, penicilina / estreptomicina. (Creada con BioRender.com)

3.3. Tratamiento farmacológico

En este trabajo se estudia la acción de los fármacos incluidos en el panel Tocriscreen Epigenetics Library (número de catálogo 6801), que está compuesto por 101 compuestos que actúan a nivel epigenético en más de 40 dianas incluyendo *readers*, *writers*, *erasers* y moduladores transcripcionales. Entre estos compuestos, se encuentra la TMZ utilizada en el tratamiento rutinario de los gliomas de alto grado y como primera línea en GBM. Los fármacos se encuentran a una concentración 10 mM en DMSO y conservados a una temperatura de -80°C.

En la Tabla 1 se presentan todos los fármacos que incluye el panel, precedidos por un número. Este número será en adelante el que represente a cada compuesto.

Tabla 1. Fármacos del panel Tocriscreen Epigenetics. Amarillo, *readers*; verde, *writers*; naranja, *erasers*; violeta, moduladores transcripcionales.

Nº	FÁRMACO	Nº	FÁRMACO	Nº	FÁRMACO
1	EML 425	35	AZ 5704	69	L Moses dihydrochloride
2	A 485	36	Mirin	70	PFI 3
3	Decitabine	37	Hesperadin hydrochloride	71	Givinostat hydrochloride
4	RG 108	38	ZM 447439	72	MS 275
5	5-Azacytidine	39	SD 1008	73	BRD 73954
6	Temozolomide	40	CP 690550 citrate	74	Sodium 4-Phenylbutyrate
7	EPZ 004777	41	AZD 1480	75	Valproic acid, sodium salt
8	JQEZ5	42	TC JL 37	76	CI 994
9	UNC 1999	43	H 89 dihydrochloride	77	PCI 34051
10	UNC 2400	44	SB 747651A dihydrochloride	78	SAHA
11	PF 06726304 acetate	45	TCS PIM-1 1	79	LMK 235
12	BIX 01294	46	CPI 203	80	SirReal 2
13	UNC 0224	47	PFI 1	81	Resveratrol
14	UNC 0646	48	(+)-JQ1	82	JIB 04
15	ML 228	49	(-)-JQ1	83	IOX 1
16	UNC 0642	50	I-BET 151 dihydrochloride	84	GSK J1
17	Ryuvidine	51	OTX 015	85	GSK J4
18	A 196	52	LY 303511	86	GSK J2
19	BAY 598	53	Bromosporine	87	GSK LSD 1 dihydrochloride
20	OICR 9429	54	BAZ2-ICR	88	Tranylcypromine hydrochloride
21	MM 102	55	BAY 299	89	RN 1 dihydrochloride
22	WDR5 0103	56	TP 472	90	OG-L002
23	Furamidine dihydrochloride	57	BI 9564	91	S 2101
24	UNC 2327	58	I-BRD9	92	TC-E 5002
25	TP 064	59	OF 1	93	Ciclopirox
26	GSK 591 dihydrochloride	60	NI 57	94	Sephin 1
27	EPZ 015666	61	PFI 4	95	BVT 948
28	MS 023 dihydrochloride	62	GSK 6853	96	Alexidine dihydrochloride
29	PRT 4165	63	NVS-CECR2-1	97	CX08005
30	VH 298	64	AZD 2461	98	GSK 2830371
31	cis VH 298	65	I-CBP 112	99	IOX 2
32	P 22077	66	Rucaparib camsylate	100	GN 44028
33	KU 60019	67	PJ 34 hydrochloride	101	TC-S 7009
34	AZ 20	68	Triptolide		

El cribado farmacológico se realizó por duplicado para las líneas celulares 981 y 985. Siguiendo el protocolo de pases celulares, se siembra un mínimo de 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos para que el cultivo sea viable. Las placas sembradas se mantienen en incubación hasta el crecimiento óptimo del cultivo, aproximadamente a los tres días dependiendo de las características del cultivo. En el momento del ensayo, se retira el medio en el que se encuentran las células y se añade la disolución de los fármacos en medio completo. Se incuban las placas al durante 24 horas. Para cada línea celular consideramos 2 controles, uno con medio completo y otro con medio completo suplementado con DMSO para descartar un posible efecto tóxico del vehículo al analizar los resultados.

En la figura 2 se ilustra el proceso de dilución y adición de los fármacos del panel Tocriscreen Epigenetics Library.

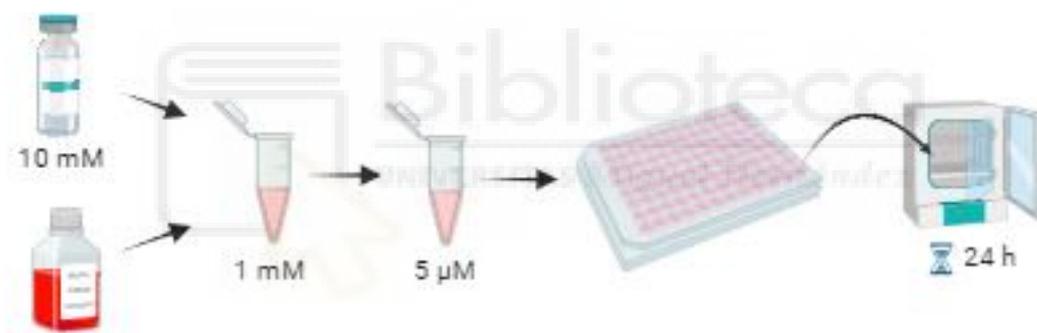


Figura 2. Proceso de dilución y adición de los fármacos. 1 mM es una dilución intermedia. (Creada con BioRender.com)

Para los fármacos que demuestren un efecto significativo se realiza una curva dosis-respuesta a diferentes concentraciones de fármaco (0, 0,5, 1, 5, 10, 50 µM) con el fin de confirmar que la afectación de la viabilidad es dependiente de la concentración. Siguiendo el mismo protocolo que para el cribado de fármacos, cada línea celular se siembra por triplicado para cada concentración del fármaco que haya resultado más interesante. Se añade a cada condición DMSO hasta llegar a 0,5 µL para poder despreciar su efecto al aumentar la concentración de fármaco.

3.4. Medida de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad de las células y el efecto de los fármacos probados, se utiliza el reactivo AlamarBlue HS (AB) (ThermoFisher). El reactivo AB es una solución no tóxica que funciona como indicador de la viabilidad celular. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de las células vivas para reducir la resazurina a resorufina. La resazurina es un compuesto de color azul, mientras que la resorufina es de color rojo. Este cambio de color permite medir cuantitativamente la viabilidad celular. Más información en Invitrogen. Alamarblue® Assay¹⁸.

Para ello, se diluye el reactivo AB con medio DMEM completo en proporción 1:10. Esta disolución se añade a cada pocillo una vez retirado el medio con fármaco y se mantiene en contacto con las células durante 4 horas. Pasado ese tiempo, los sobrenadantes de cada pocillo se pasan a otra placa de 96 pocillos para la lectura de absorbancia.

Las placas con los sobrenadantes se llevan al lector de placas Infinite M Nano (Tecan) para medir absorbancia a dos longitudes de onda (λ): 570 y 600 nm que corresponden al máximo de absorción de resorufina y resazurina respectivamente como se muestra en la figura 3 El máximo de absorción de resazurina se utiliza como longitud de onda de referencia.

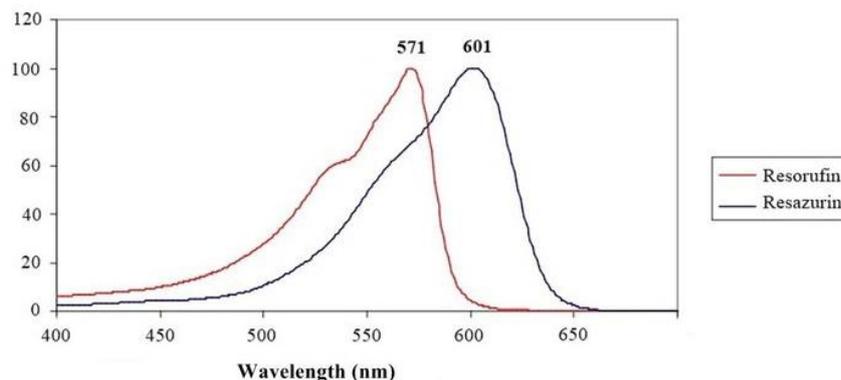


Figura 3. Espectro de absorción de resazurina y resorufina. (Tomado de: Coelho, Lúgia & Silva, Jorge & Pinheiro, Carla. (2018). Vascularization: plant decellularization and electrospinning techniques for the development of small and medium caliber blood vessels.)

El procedimiento descrito se esquematiza en la figura 4.

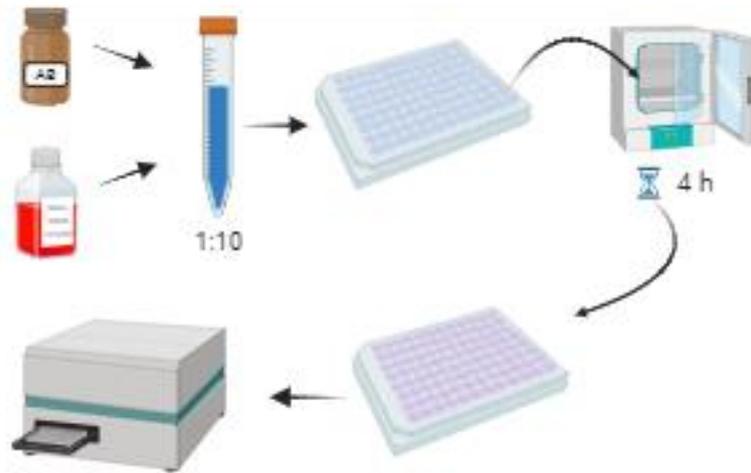


Figura 4. Proceso por el que se somete a las células a una solución de AB para analizar su viabilidad. (Creada con BioRender.com)

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se calcula el porcentaje en el que las células tratadas con los fármacos reducen la resazurina en comparación con los controles. Para ello, se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{(\varepsilon_{OX})_{\lambda 2} A_{\lambda 1} - (\varepsilon_{OX})_{\lambda 1} A_{\lambda 2}}{(\varepsilon_{OX})_{\lambda 2} A^{\circ}_{\lambda 1} - (\varepsilon_{OX})_{\lambda 1} A^{\circ}_{\lambda 2}} \times 100$$

Donde:

ε_{OX} = coeficiente de extinción molar de la forma oxidada de alamarBlue.

A = promedio de absorbancia de los pocillos de tratados con los fármacos.

A° = promedio de absorbancia de los pocillos de control.

$\lambda 1$ = 570nm

$\lambda 2$ = 600nm

Se realiza la prueba t de Student a los datos obtenidos para ver si son estadísticamente significativos. Se aceptan valores de p inferiores a 0,1.

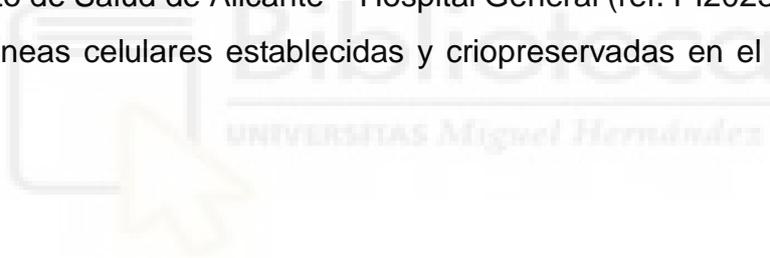
3.5. Imágenes de contraste de fase

Para documentar la pérdida de células de forma visual se tomaron fotografías de algunos cultivos en el microscopio Nikon Eclipse TS100 (objetivo 20x).

3.6. Declaración ética

Este proyecto se ha realizado de acuerdo con la legislación regional, nacional y europea según la Carta de Derechos Fundamentales de la Unión Europea, la Convención Europea sobre Derechos Humanos y la Declaración de Helsinki, la Ley de Investigación biomédica, Ley Orgánica de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y Reglamento General de Protección de Datos.

Para la realización del presente Trabajo de Fin de Grado, se solicitó autorización al Comité de Ética para la Investigación con medicamentos (CEIm) del Departamento de Salud de Alicante – Hospital General (ref. PI2023-085) para el uso de las líneas celulares establecidas y criopreservadas en el Biobanco de ISABIAL.



4. RESULTADOS

4.1. Las líneas celulares de glioblastoma muestran diferentes perfiles de sensibilidad farmacológica

En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados de viabilidad celular de las líneas celulares 981 y 985 respectivamente, tras el cribado con el panel Tocriscreen Epigenetics. Los resultados se expresan como porcentaje en el que las células tratadas con los fármacos reducen la resazurina en comparación con los controles. Por tanto, a menor porcentaje, menor número de células viables ya sea por inhibición del crecimiento o por muerte celular. Se ha aplicado una escala de color para poder hacer una rápida interpretación de los fármacos que pueden resultar interesantes: el color rojo es más intenso para los valores más bajos y se degrada hasta el blanco a medida que aumenta el valor, siendo blanco a partir del 100%. La condición control solamente con medio completo y el control con medio completo suplementado con DMSO no mostraron diferencias, por lo que se usaron como un único control (sin tratamiento) para aumentar el poder estadístico de nuestras comparaciones.

En la Tabla 2 podemos ver que los fármacos que obtienen menor porcentaje de reducción de la resazurina son el 5, el 37, el 45 y el 66. De estos, el único que tiene la significación estadística deseada es el 37 correspondiente a hidrocloreto de hesperadina.

En la Tabla 3 solo destacan los fármacos 17 y 33, siendo estadísticamente significativo el primero de ellos, correspondiente a ryuvidina. El resultado para el fármaco 65 no se incluye ya que la lectura de absorbancia arrojaba valores que no permitían realizar correctamente el cálculo (valores negativos en el numerador).

Los resultados muestran que sería interesante continuar con el estudio del efecto del hidrocloreto de hesperadina y la ryuvidina en el tratamiento del glioblastoma, siendo los compuestos más eficaces para influir en la viabilidad celular a la concentración usada.

Tabla 2. Porcentaje en el que las células tratadas con los fármacos reducen la resazurina con respecto las células sin tratar en la línea celular 981.

FÁRMACO	%								
1	109,11	21	102,73	41	105,67	61	98,59	81	95,88
2	92,08	22	88,92	42	144,07	62	72,70	82	84,48
3	90,89	23	96,56	43	113,75	63	67,64	83	79,63
4	82,55	24	87,63	44	68,83	64	78,90	84	77,96
5	49,28	25	87,00	45	59,04	65	74,32	85	77,77
6	82,65	26	78,28	46	73,24	66	55,72	86	82,06
7	121,60	27	107,42	47	86,90	67	91,98	87	78,63
8	94,61	28	100,95	48	83,85	68	102,14	88	80,61
9	64,38	29	98,24	49	85,35	69	84,07	89	85,34
10	83,05	30	62,22	50	96,75	70	89,81	90	87,92
11	84,27	31	90,10	51	90,49	71	119,55	91	76,08
12	76,86	32	75,63	52	76,05	72	97,26	92	111,63
13	93,43	33	88,83	53	91,87	73	88,40	93	83,53
14	94,96	34	77,58	54	101,25	74	79,52	94	88,68
15	123,74	35	103,70	55	75,65	75	82,40	95	82,04
16	82,29	36	68,99	56	70,17	76	84,25	96	88,34
17	191,52	37	57,62	57	111,35	77	70,35	97	88,08
18	80,88	38	85,16	58	103,65	78	107,30	98	78,01
19	89,39	39	107,66	59	96,73	79	112,29	99	78,40
20	87,99	40	78,19	60	93,06	80	95,03	100	71,26
								101	95,97

Tabla 3. Porcentaje en el que las células tratadas con los fármacos reducen la resazurina con respecto las células sin tratar en la línea celular 985.

FÁRMACO	%								
1	95,66	21	109,56	41	93,90	61	125,94	81	108,13
2	96,83	22	113,09	42	100,75	62	138,66	82	97,83
3	108,75	23	92,44	43	142,35	63	146,79	83	111,92
4	100,45	24	97,70	44	102,95	64	104,38	84	102,06
5	112,01	25	99,65	45	107,11	65		85	120,27
6	104,09	26	108,27	46	105,67	66	83,46	86	115,30
7	104,74	27	96,21	47	139,05	67	91,27	87	118,26
8	116,45	28	104,02	48	118,80	68	91,66	88	105,48
9	100,48	29	102,70	49	120,66	69	102,09	89	116,34
10	99,32	30	143,83	50	119,48	70	108,97	90	115,92
11	121,44	31	117,00	51	112,05	71	91,26	91	107,83
12	102,57	32	88,69	52	110,75	72	114,10	92	105,69
13	101,69	33	66,81	53	103,69	73	110,69	93	107,59
14	114,61	34	91,21	54	94,81	74	108,99	94	102,66
15	80,44	35	99,42	55	102,09	75	113,06	95	96,44
16	95,51	36	106,57	56	112,33	76	116,14	96	103,48
17	64,93	37	84,90	57	111,81	77	116,95	97	101,52
18	94,90	38	99,61	58	103,65	78	117,63	98	113,19
19	96,54	39	121,19	59	108,04	79	123,13	99	117,33
20	89,07	40	107,27	60	116,45	80	106,21	100	103,49
								101	111,68

4.2. Las sensibilidades farmacológicas son dependientes de la concentración

La línea 981 se volvió a sembrar para obtener la curva dosis-respuesta frente al hidrocloreuro de hesperadina. Como se puede observar en la Figura 5, al aumentar la concentración se reduce la viabilidad celular.

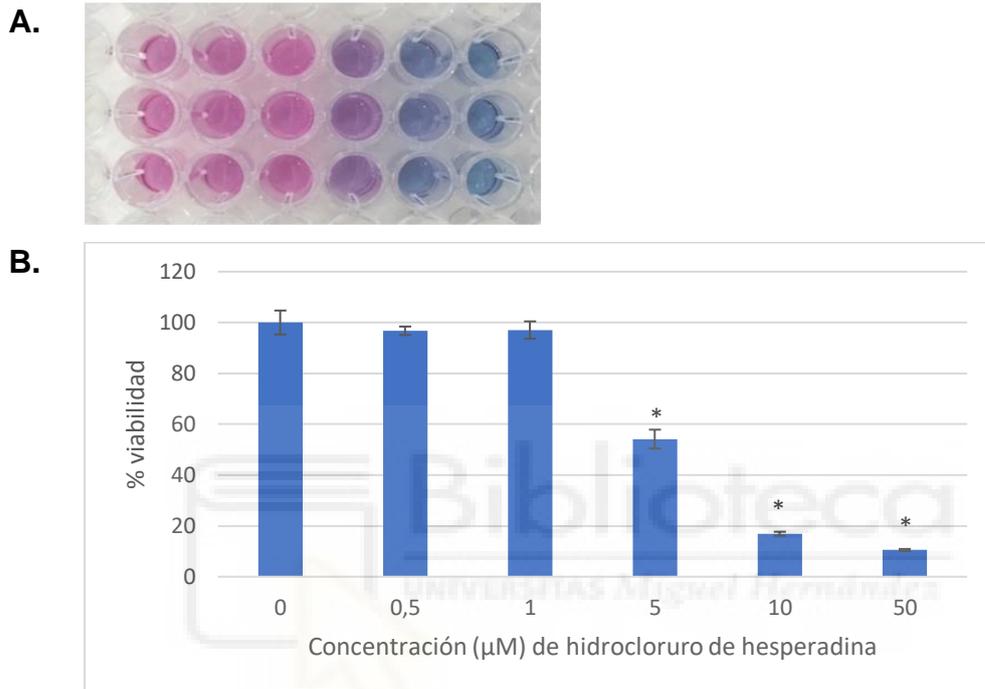


Figura 5. Viabilidad celular en función de la concentración. A. Imagen de la placa en la que se observa el cambio de color del reactivo AB. B. Gráfico de barras en el que se representa la disminución de viabilidad celular dependiente de concentración en forma de promedio \pm desviación estándar. *, $P < 0.1$ con respecto control, test t de Student.

De igual forma procedimos con la línea 985 en respuesta a ryuvidina (Figura 6).

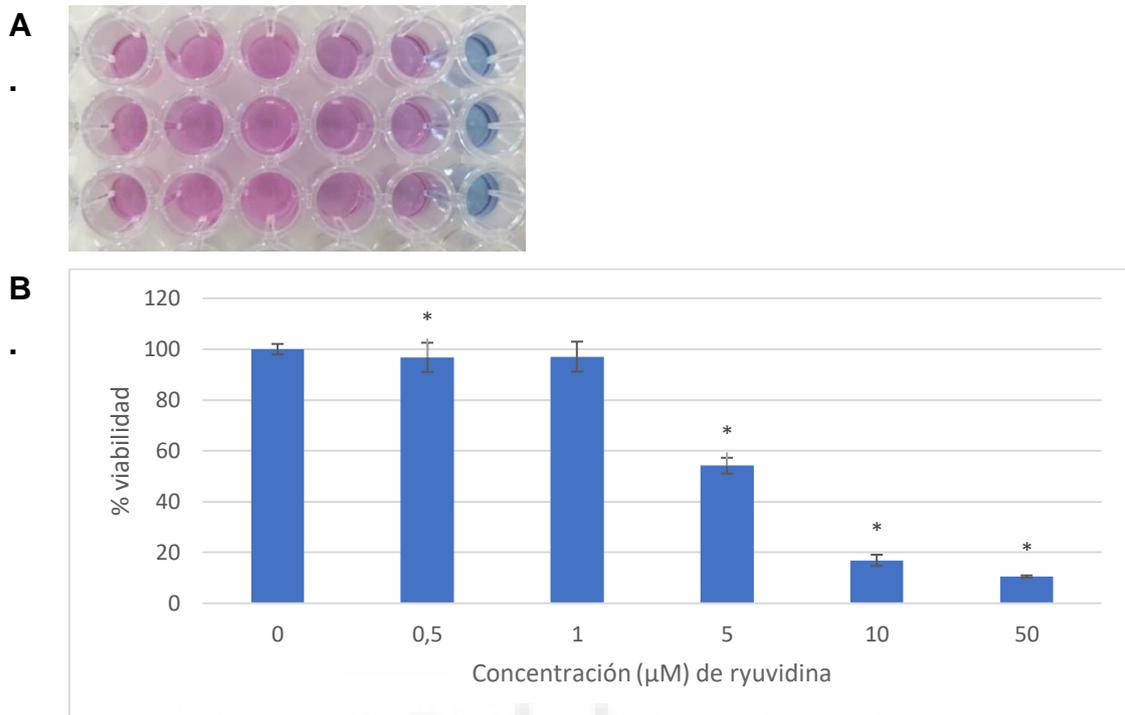


Figura 6. Viabilidad celular en función de la concentración. A. Imagen de la placa en la que se observa el cambio de color del reactivo AB. B. Gráfico de barras en el que se representa la disminución de viabilidad celular dependiente de concentración en forma de promedio \pm desviación estándar. *, $P < 0.1$ con respecto control, test t de Student.

Para verificar si estos efectos son generalizables, analizamos una tercera línea celular, la 748. Se observó que esta línea era sensible a ambos compuestos aunque con mayor sensibilidad a la ryuvidina, tal y como se aprecia en el ensayo colorímetro y visualmente a nivel celular (Figuras 7,8, 9 y 10).

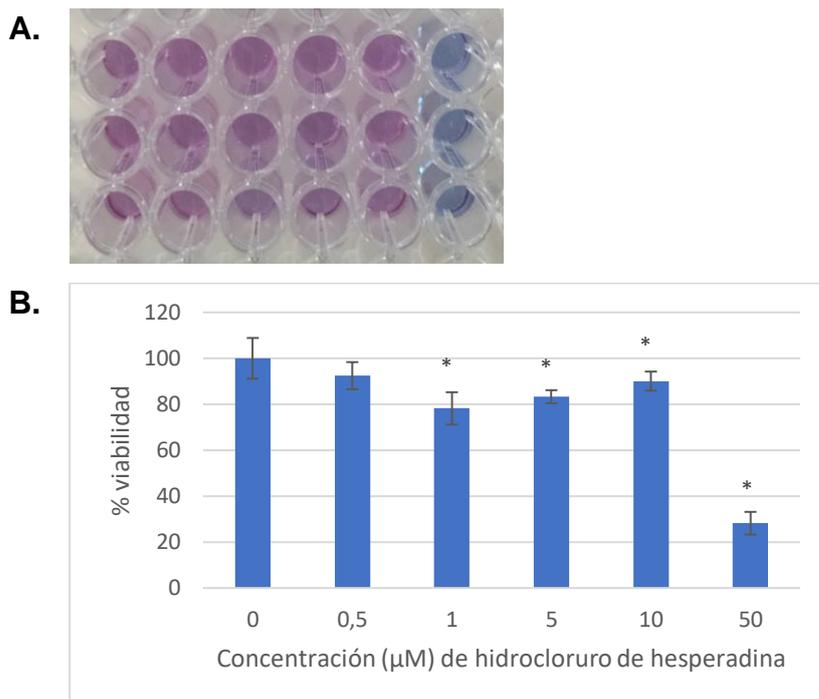


Figura 7. Viabilidad celular en función de la concentración. A. Imagen de la placa en la que se observa el cambio de color del reactivo AB. B. Gráfico de barras en el que se representa la disminución de viabilidad celular dependiente de concentración en forma de promedio \pm desviación estándar. *, $P < 0.1$ con respecto control, test t de Student.

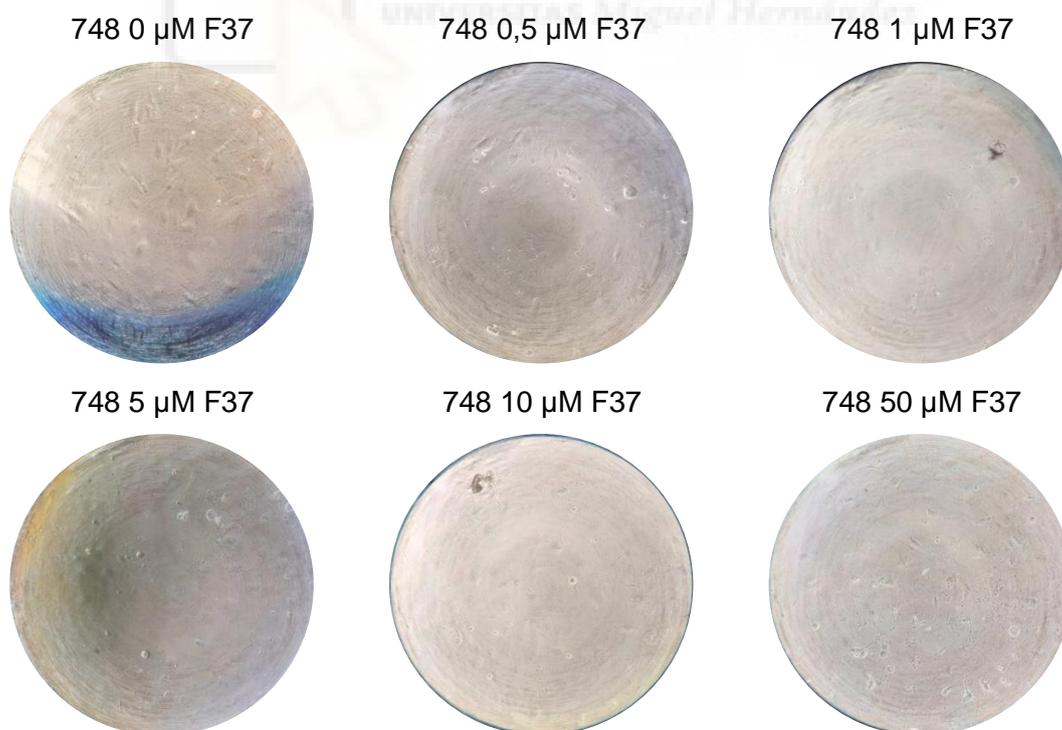


Figura 8. Imágenes de los pocillos (20x) en la que se representa en cambio en la morfología en función de la concentración. En la parte superior de cada imagen se indica la concentración de fármaco correspondiente.

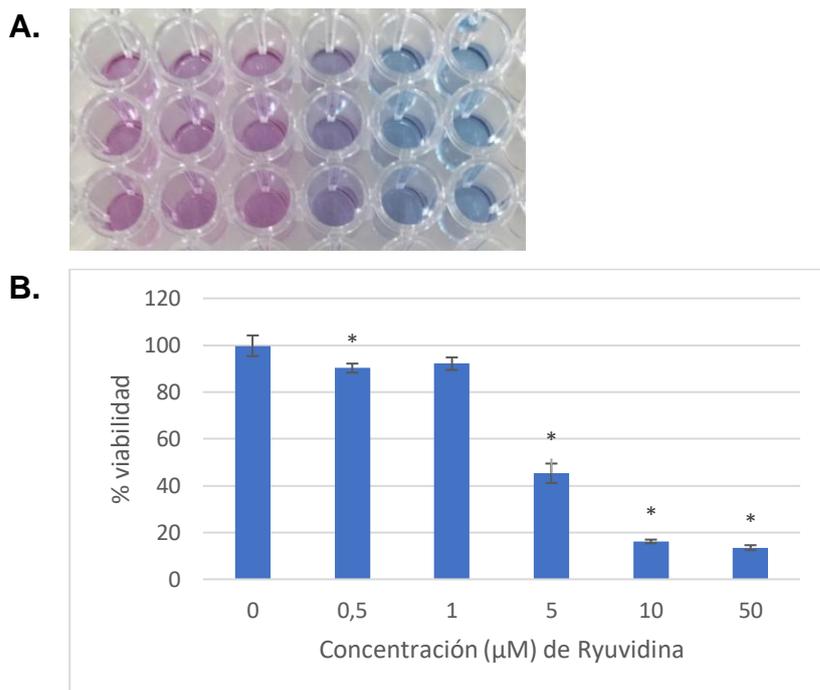


Figura 9. Viabilidad celular en función de la concentración. A. Imagen de la placa en la que se observa el cambio de color del reactivo AB. B. Gráfico de barras en el que se representa la disminución de viabilidad celular dependiente de concentración en forma de promedio \pm desviación estándar. *, $P < 0.1$ con respecto control, test t de Student.

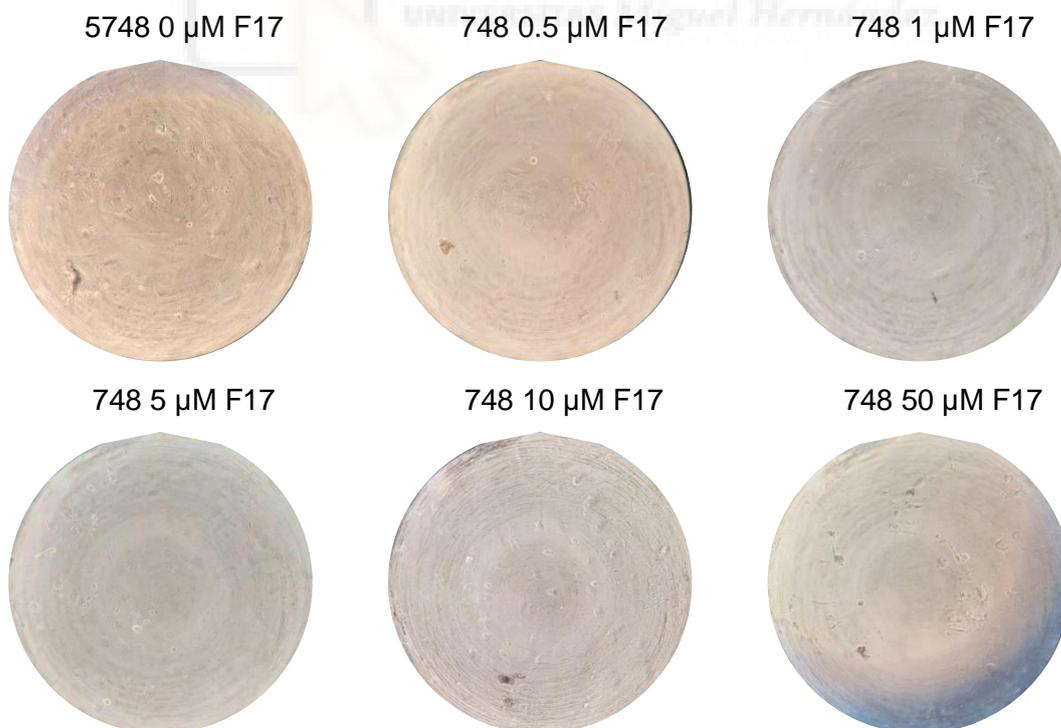


Figura 10. Imágenes de los pocillos (20x) en la que se representa en cambio en la morfología en función de la concentración. En la parte superior de cada imagen se indica la concentración de fármaco correspondiente.

5. DISCUSIÓN

El GBM es la neoplasia más maligna y más prevalente del SNC, con un pronóstico bastante desfavorable pese al avance en las estrategias terapéuticas. El estudio de nuevas opciones terapéuticas puede encaminar a un mejor pronóstico e incluso a la curación de este tipo de tumores. Estudios previos han plasmado la posibilidad de encontrar en la modulación epigenética un tratamiento más efectivo, pero que se enfrenta a problemas de especificidad, solubilidad y quimiorresistencia¹⁴.

En este estudio se ha valorado el efecto de 101 compuestos moduladores epigenéticos sobre cultivos primarios de GBM a dosis relativamente bajas para identificar aquellos más eficaces. Los resultados obtenidos indican que tanto el hidrocloreuro de hesperadina como la ryuvidina pueden ser útiles en el tratamiento del GBM.

El hidrocloreuro de hesperadina es un inhibidor potente de la Aurora quinasa B (AURKB). Se ha visto que los GBM resistentes a TMZ y recurrentes presentan altos niveles de AURKB, por lo que es una diana interesante para mejorar la respuesta al tratamiento. Las quinazinas regulan diferentes procesos en las células como la transmisión de señales. Las aurora quinazinas, en concreto la AURKB, participan en la división celular regulando la separación de las cromátidas. Su elevación da lugar a separaciones desiguales de los cromosomas y a la formación de células con número anormal de cromosomas, que pueden ser la base de las futuras células tumorales. Wahafu et al demostraron que hesperadina en combinación con TMZ prolongó drásticamente la supervivencia en ratones inhibiendo la proliferación de células tumorales¹⁹. En este contexto, sería interesante ampliar el estudio y valorar la capacidad antiproliferativa de hidrocloreuro de hesperadina en combinación con TMZ comparándola con la de ambos por separado.

La ryuvidina es un inhibidor de la proteína lisina metiltransferasa (PKMT) SETD8. Esta proteína está implicada en procesos esenciales como la replicación del DNA, la respuesta al daño celular, la modulación de la transcripción y la regulación del ciclo celular. La PKMT SETD8 es capaz de monometilar la lisina

20 de la histona H4; la supresión de la monometilación conduce a descondensación de la cromatina y pone de manifiesto su papel en la replicación²⁰. En la literatura no hay descrita relación entre ryuidina y GBM, pero sí se menciona en diferentes estudios como tratamiento para otros tipos de cáncer^{21,22}. Con los resultados obtenidos en este estudio y los resultados de los estudios mencionados podemos pensar que la ryuidina puede ser de utilidad también en este tipo de gliomas siendo necesario realizar un estudio más amplio para confirmarlo.

Respecto a los resultados negativos, no se puede descartar que el resto de fármacos del panel tengan utilidad terapéutica, ya que podrían utilizarse en combinación con otros fármacos o terapias o a concentraciones más altas, como podría ser el caso de la TMZ, que está incluida en el panel. Además, se han probado en un número limitado de líneas celulares. La identificación de fármacos más eficaces que la TMZ a dosis bajas abre nuevas opciones terapéuticas para el GBM.

En cualquier caso, hemos confirmado la hipótesis de que las células tumorales de GBM responden a diversos moduladores de la epigenética y que esta respuesta es susceptible de ser diferente para cada paciente, dado que cada una de las tres líneas celulares estudiadas responde de manera diferente a los moduladores. Sin embargo, es cierto que el número de pases puede afectar a las diferencias encontradas entre las líneas y que necesitaríamos aumentar el número de líneas para obtener conclusiones más robustas.

Al tratarse de un trabajo final de grado el estudio ha presentado limitaciones para su realización como es el tiempo limitado para la realización de más experimentos que permitieran obtener respuestas más claras, además de aumentar el número de replicados experimentales que permitieran el uso de un umbral de significatividad ($P < 0,05$) más aceptado.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos extraer de este estudio son:

1. Cada línea celular de GBM presenta diferentes características morfológicas y responde de diferente manera a los moduladores epigenéticos.
2. El tratamiento personalizado del GBM puede ser una opción terapéutica esperanzadora, pero es necesario continuar estudiando las opciones más efectivas.
3. Los resultados obtenidos para hidrocloreto de hesperadina, en conjunto con los resultados de otros estudios, demuestran que puede ser una muy buena opción para mejorar la supervivencia de los pacientes con GBM.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Diccionario de cáncer del NCI. (2011, febrero 2). Instituto Nacional del Cáncer.
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/glioblastoma>
2. Liu, C., Sage, J. C., Miller, M. R., Verhaak, R. G., Hippenmeyer, S., Vogel, H., Foreman, O., Bronson, R. T., Nishiyama, A., Luo, L., & Zong, H. (2011). Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell*, 146(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.014>
3. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
4. Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-oncology*, 22(12 Suppl 2), iv1–iv96.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>
5. Zhu, P., Du, X. L., Lu, G., & Zhu, J. J. (2017). Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget*, 8(27), 44015–44031.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17054>
6. Aljure, V. de J., Pulido-Arias, E. A., Rodríguez-Monroy, J. A., Rodríguez-Mateus, M. N., & Ramos-Hernández, J. A. (2016). Diagnóstico diferencial de lesiones cerebrales con realce en anillo en tomografía computarizada y resonancia magnética. *Duazary*, 13(2), 149–158.
<https://doi.org/10.21676/2389783X.1721>
7. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
8. Centro Nacional de Información Biotecnológica (2024). Resumen de compuestos de PubChem para CID 5394, temozolomida. Obtenido de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Temozolomide>.

9. Sonia Tejada Solís, Gerard Plans Ahicart, Irene Iglesias Lozano, Cristian de Quintana Schmidt, Alejandro Fernández Coello, Cristina Hostalot Panisello, Luis Ley Urzaiz, Juan Carlos García Romero, Ricardo Díez Valle, Josep González Sánchez, Sara Duque, Consenso sobre guías de tratamiento de los glioblastomas elaborado por el Grupo de Trabajo de Neurooncología (GTNO) de la SENE, Neurocirugía Volume 31, Issue 6, 2020, Pages 289-298, ISSN 1130-1473, <https://doi.org/10.1016/j.neucir.2020.06.001>.
10. *Epigenética*. (s. f.). Genome.gov. Recuperado de: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Epigenetica>
11. Rojas-Lemus, Marcela, & Milán-Chávez, Rebeca. (2016). Los límites entre la histología y la bioquímica: observando al núcleo celular. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(1), 45-56. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000100045&lng=es&tlng=es.
12. García Robles, Reggie, Ayala Ramírez, Paola Andrea, & Perdomo Velásquez B., Sandra Paola. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de la Salud*, 10(1), 59-71. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732012000100006&lng=en&tlng=es.
13. Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European journal of pharmacology*, 837, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021>
14. Valor, L. M., & Hervás-Corpión, I. (2020). The Epigenetics of Glioma Stem Cells: A Brief Overview. *Frontiers in oncology*, 10, 602378. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.602378>
15. Thon, N., Kreth, S., & Kreth, F. W. (2013). Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. *Oncotargets and therapy*, 6, 1363–1372. <https://doi.org/10.2147/OTT.S50208>
16. Williams, M. J., Singleton, W. G., Lewis, S. P., Malik, K., & Kurian, K. M. (2017). Therapeutic Targeting of Histone Modifications in Adult and Pediatric High-Grade Glioma. *Frontiers in oncology*, 7, 45. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00045>
17. Ventero, M. P., Fuentes-Baile, M., Quereda, C., Perez-Valeciano, E., Alenda, C., Garcia-Morales, P., Esposito, D., Dorado, P., Manuel Barbera, V., & Saceda, M. (2019). Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. *PloS one*, 14(2), e0212581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212581>

18. Invitrogen. Alamarblue® Assay. No 5501959. U.S. Patent. 2007. Disponible en:
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TI%20alamarBlue%20Rev%201.1.pdf
19. Ref Alafate, W., Wang, M., Zuo, J., Wu, W., Sun, L., Liu, C., Xie, W., & Wang, J. (2019). Targeting Aurora kinase B attenuates chemoresistance in glioblastoma via a synergistic manner with temozolomide. *Pathology, research and practice*, 215(11), 152617.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152617>
20. Blum, G., Ibáñez, G., Rao, X., Shum, D., Radu, C., Djaballah, H., Rice, J. C., & Luo, M. (2014). Small-molecule inhibitors of SETD8 with cellular activity. *ACS chemical biology*, 9(11), 2471–2478.
<https://doi.org/10.1021/cb500515r>
21. Burke, A. J., Ali, H., O'Connell, E., Sullivan, F. J., & Glynn, S. A. (2016). Sensitivity Profiles of Human Prostate Cancer Cell Lines to an 80 Kinase Inhibitor Panel. *Anticancer research*, 36(2), 633–641.
<https://ar.iijournals.org/content/anticancer/36/2/633.full.pdf>
22. Ghasemi, F., Black, M., Sun, R. X., Vizeacoumar, F., Pinto, N., Ruicci, K. M., Yoo, J., Fung, K., MacNeil, D., Palma, D. A., Winkquist, E., Mymryk, J. S., Ailles, L. A., Datti, A., Barrett, J. W., Boutros, P. C., & Nichols, A. C. (2018). High-throughput testing in head and neck squamous cell carcinoma identifies agents with preferential activity in human papillomavirus-positive or negative cell lines. *Oncotarget*, 9(40), 26064–26071. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25436>