



Universitat
de les Illes Balears

Caracterización del efecto molecular de fenotiazinas antipsicóticas en células de glioma: Estudio del potencial cooperativo con temozolomida.

Lucía Ferro Sánchez

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en Investigación Biomédica
(Especialidad/Itinerario en Investigación en Cáncer)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2017/18

Fecha: 21/09/2018

Nombre Tutor del Trabajo: Dra. Silvia Fernández de Mattos

Índice

1. Introducción.....	5
1.1. Glioma	5
1.2. Caracterización molecular del tumor.....	5
1.3. El factor de transcripción FOXO3a	5
1.4. Tratamiento	6
1.4.1. Fármacos antipsicóticos: Fenotiazinas	6
2. Objetivos	7
3. Materiales y métodos.....	7
3.1. Líneas celulares y reactivos.....	7
3.2. Medición de la viabilidad celular.....	7
3.3. Ensayos de clonogenicidad	8
3.4. Inmunofluorescencia.....	8
3.5. Análisis estadístico	8
4. Resultados	9
4.1. Efecto de TFP, TRD y TMZ sobre la viabilidad de las líneas celulares de GBM. Cálculo de la IC ₅₀	9
4.2. Análisis de cooperación entre fármacos: TMZ con TFP o TRD.	10
4.3. Efecto celular y molecular de las fenotiazinas antipsicóticas en líneas celulares de GBM.....	13
4.3.1. Estudio del crecimiento celular a largo plazo de las líneas celulares de GBM frente TMZ, TRD o la combinación de ambos.....	13
4.3.2. Estudio de la localización intracelular de FOXO3a en líneas celulares de GBM y cultivos primarios en respuesta a un tratamiento con fenotiazinas antipsicóticas.....	14
5. Discusión	16
6. Conclusiones	17
6. Bibliografía	18

Resumen

Los gliomas son tumores que se originan a partir de las células madre de la neuroglia o de las células progenitoras, siendo el glioblastoma (GBM) el tumor cerebral primario más común y agresivo. La terapia convencional para el GBM consiste en una resección tumoral seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolomida (TMZ), no obstante, los pacientes acaban siendo resistentes debido principalmente a una subpoblación de células denominadas *Glioma Stem Cells* (GSC). Actualmente, se apuesta por la reutilización de drogas (*drug repositioning*), una estrategia terapéutica más segura y económica. En esta línea, el objetivo principal del presente estudio es evaluar el potencial coadyuvante de las fenotiazinas antipsicóticas (trifluoperazina (TFP) y tioridazina (TRD)), fármacos utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia, en líneas celulares de GBM (U87MG, LN229 y U251). Asimismo, estudiar el papel del supresor tumoral FOXO3a en respuesta a las fenotiazinas, ya que resultados previos del grupo de investigación demuestran que inhiben su exportación nuclear. El análisis isoblográfico determinó que de las 9 combinaciones probadas (TMZ:TFP y TMZ:TRD), la 1:1 y la 3:1 eran siempre sinérgicas en U87MG y en U251. Por otro lado, el estudio de clonogenicidad reveló que, el efecto a largo plazo de TRD no era permanente ya que las células no perdían la capacidad de formar colonias. Finalmente, se demostró claramente que las fenotiazinas antipsicóticas favorecían la importación nuclear de FOXO3a y, por consiguiente, su activación. Todos estos resultados son muy prometedores y se podrían llegar a sentar las bases de un ensayo clínico.

Abstract

Gliomas are tumors that derive from neuroglia stem or progenitor cells, among these glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor. Conventional therapy for GBM consists of tumor resection followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ), however, patients end up being resistant, mainly, due to a subpopulation of cells called Glioma Stem Cells (GSC). The need for more effective anti-cancer drugs has sparked a growing interest for drug repositioning, a safer and cheaper therapeutic strategy. In this line, the main objective of the present study is to evaluate the adjuvant potential of antipsychotic phenothiazines (trifluoperazine (TFP) and thioridazine (TRD)), drugs used in the treatment of schizophrenia, in GBM cell lines (U87MG, LN229 and U251). In addition, we aimed to study the role of the tumor suppressor FOXO3a in response to phenothiazines, as previous results of the research group demonstrate that these drugs inhibit FOXO3a nuclear export. First, the isobiological analysis determined that two of the nine ratios tested (TMZ: TFP and TMZ: TRD) were always synergistic in U87MG and in U251 cells. Secondly, the clonogenic assay revealed that, the long term effect of phenothiazines was not permanent because the cancer cells did not lose the capacity to form colonies. Finally, it was clearly demonstrated that phenothiazines induced the nuclear import of FOXO3a and, consequently, its activation. These results are very promising and the basis of a clinical trial could be established.

1. Introducción

1.1. Glioma

Los gliomas son neoplasias que se originan a partir de las células de la glía, siendo los más comunes del sistema nervioso central (SNC). En función del tipo celular de origen existen 3 tipos de gliomas: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependiomas; no obstante, en la actualidad, la clasificación se ha vuelto más detallada, basándose principalmente en marcadores moleculares, genéticos y epigenéticos. Independientemente del tipo, los gliomas se caracterizan por ser unos tumores difusos e infiltrantes con una elevada proliferación vascular en el parénquima cerebral circundante¹.

El glioblastoma multiforme (GBM), la forma más agresiva de astrocitoma, tiene un pésimo pronóstico y, asimismo, los pacientes presentan una supervivencia media de 18 meses².

1.2. Caracterización molecular del tumor

Los gliomas primarios y secundarios se caracterizan por ciertas alteraciones moleculares. En los primarios predomina la mutación y/o la amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutaciones en el supresor tumoral PTEN y pérdida del cromosoma 10. Por otro lado, los tumores secundarios presentan mutaciones en el enzima isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1), mutaciones en p53 y pérdida del brazo corto del cromosoma 19².

En cancer, la vía de señalización mitogénica PI3K/Akt/mTOR es comúnmente alterada y a pesar de su complejidad, se considera como una diana terapéutica prometedora. En un 88% de los casos de GBM, esta vía se encuentra activada de manera aberrante y se ha determinado que, en este caso, está implicada en la regulación de la motilidad, supervivencia y proliferación celular³.

1.3. El factor de transcripción FOXO3a

Uno de los efectores *downstream* más importantes de la vía de señalización PI3K/Akt es la familia de factores de transcripción *Forkhead Box* de tipo O (FOXO). En humanos, esta familia consta de 4 miembros FOXO1, FOXO3, FOXO4 y FOXO6, siendo los 3 primeros supresores tumorales⁴.

FOXO3a es una proteína clave que controla la transcripción de un gran número de genes implicados en el control del ciclo celular, del daño en el DNA y de la apoptosis celular. Una de las funciones principales de FOXO es la inhibición del ciclo celular, concretamente el arresto en la fase G1 mediante la sobreexpresión de las CDKIs (p27^{KIP1} y p21^{WAF1/CIP1}), proteínas que inhiben a las CDKs⁵.

La localización celular de FOXO3a depende de modificaciones post-traduccionales (fosforilación, acetilación y ubiquitinización). Estudios funcionales sugieren que, en las células cancerígenas en proliferación, FOXO3a está inactivado por vías de señalización constitutivamente activas como PI3K/Akt o RAS/MAPK/ERK. La activación de estas vías resulta en la fosforilación de los factores de transcripción FOXO y su consiguiente secuestro citoplasmático y/o degradación a través de la vía ubiquitin-proteosoma.

1.4. Tratamiento

La terapia convencional para el GBM consiste en una resección tumoral seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolomida (TMZ), no obstante, está limitada en eficacia debido a la elevada tasa de recurrencia, resistencia a la terapia y un deterioro neurológico devastador. Comprender los mecanismos de resistencia a TMZ en GBM contribuye a mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos convencionales. Un gran número de investigaciones relacionan la actividad del enzima O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT), el cual elimina los grupos metilo del DNA responsables de la citotoxicidad generada en la célula, de ciertos GBM con la resistencia a TMZ. No obstante, se ha descrito que más del 40% de gliomas con bajos niveles de MGMT siguen siendo resistentes a TMZ, por ello, la investigación en este aspecto debe continuar⁶.

En relación a este punto, las investigaciones más recientes apuntan a que la resistencia de los GBM al tratamiento depende de una subpoblación de células responsable de la iniciación del tumor cerebral, las *Glioma Stem Cells* (GSC)^{7,8,9}. Estas células normalmente permanecen en su sitio de origen tras la resección y, además, no se ven afectadas por la quimioterapia favoreciendo la infiltración tumoral y la recurrencia debido a su capacidad de autorenovación y su potencial de diferenciación en múltiples linajes¹⁰.

En la última década, se han realizado muchos estudios sobre este tipo de tumor en relación con la prognosis y respuesta al tratamiento¹¹. Se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas como la inmunoterapia o la nanomedicina, enfocada en gran medida al diseño de nanosistemas de liberación de fármacos que prometen revolucionar las terapias convencionales¹².

1.4.1. Fármacos antipsicóticos: Fenotiazinas

Otro de los grandes retos del tratamiento del GBM es la baja distribución de los agentes quimioterapéuticos en el cerebro, debido a que la barrera hematoencefálica restringe el paso de moléculas grandes e hidrofílicas. Asimismo, hay otros factores que limitan la retención de los fármacos en el tumor como la presión intersticial y el diferente sistema inmunológico que presenta el cerebro. Por todo ello, actualmente se apuesta por los antipsicóticos como una terapia potencial para GBM¹³.

Esta terapia recibe el nombre de reutilización de drogas (*drug repositioning* o *drug repurposing*), la cual consiste en utilizar compuestos aprobados por la FDA (*Food And Drug Administration*) para el tratamiento de otras enfermedades¹⁴. Los fármacos antipsicóticos son unos buenos candidatos para el tratamiento del GBM porque son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y algunos estudios han demostrado que la incidencia de cancer en los pacientes con esquizofrenia es inversamente proporcional al tratamiento con antipsicóticos¹⁵.

Las fenotiazinas han sido utilizadas como fármacos antipsicóticos durante siglos y algunas de ellas como la trifluoperazina (TFP) y la tioridazina (TRD) han demostrado que presentan un efecto antitumoral *in vivo* e *in vitro*¹⁶.

En modelos animales se ha demostrado que TFP inhibe la proliferación y la invasión celular, así como, la muerte celular en muchos tipos de tumores. El mecanismo de acción descrito para TFP, se basa en la habilidad para unirse e inhibir a la calmodulina (CaM)¹⁷. De esta manera, se

propone a TFP como un potencial fármaco terapéutico contra el GBM por la alteración que produce en la señalización del calcio.

Recientemente se ha descrito que TRD induce la fragmentación celular e incrementa la actividad caspasa. Además, activa tanto la apoptosis como la autofagia en células de GBM, siendo la autofagia un importante mecanismo subyacente a los efectos de TRD¹⁸.

2. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Determinar el efecto de las fenotiazinas antipsicóticas (TFP y TRD) y de TMZ sobre la viabilidad celular de líneas celulares LN229, U87MG y U251. Cálculo de la IC₅₀.
2. Estudiar el potencial cooperativo de las fenotiazinas antipsicóticas con TMZ en las líneas celulares U251 y U87MG.
3. Evaluar el efecto celular y molecular de las fenotiazinas antipsicóticas en líneas celulares y cultivos primarios de GBM. Papel de FOXO3a.

3. Materiales y métodos

3.1. Líneas celulares y reactivos

El presente estudio *in vitro* se realizó con 3 líneas celulares de GBM: U87MG, LN229 y U251, las cuales fueron cedidas por el Dr. Joan Seone (Vall d'Hebron Instituto de investigación, Barcelona). Las células primarias derivadas de paciente (p#04) se establecieron a partir de una muestra diagnosticada como GBM, proporcionada por los Servicios de Neurocirugía y Anatomía Patológica (Hospital Universitari Son Espases, Illes Balears). Las líneas celulares crecieron en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (FBSi) y un 1% de penicilina/estreptomina, todos adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich, St. Louis, CO, USA. Las células fueron mantenidas en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂ hasta llegar a un 70% de confluencia. Se realizaron subcultivos de manera rutinaria, así como tests de detección de contaminación por micoplasma. Las tres líneas celulares se utilizan dentro de su primer mes después de su descongelación.

Las fenotiazinas (TFP y TRD) y TMZ fueron adquiridas de la casa comercial Sigma-Aldrich y adicionadas directamente al medio de cultivo a las concentraciones indicadas para cada experimento. Asimismo, el tiempo de duración del tratamiento se encuentra especificado en las leyendas de las figuras.

3.2. Medición de la viabilidad celular

El objetivo de este experimento es determinar la concentración máxima inhibitoria (IC₅₀) de TFP, TRD y TMZ en las líneas celulares U87MG, LN229 y U251 a 96h.

Para la realización de los ensayos de viabilidad celular, 2.5×10^3 células fueron sembradas en placas de 96 pocillos. A las 24h, se realizó el tratamiento a la concentración que se especifica en cada pie de figura. Después de 4 días, las células se procesaron con el kit *CellTiter-Glo Luminiscent Assay* (Promega, Madison, WI) para medir la viabilidad celular, según las

instrucciones del fabricante. La luminiscencia fue detectada mediante el lector multi-modal de microplacas Synergy™ HTX de BioTek.

3.3. Ensayos de clonogenicidad

Con este experimento se pretendió analizar el efecto de la combinación de temozolomida con TRD a largo plazo. Para ello, las células crecieron en placas de 6 pocillos (p6) y a las 24h se realizaron diferentes tratamientos:

- ❖ Una dosis fija de TRD (7,5 μ M) durante 24h.
- ❖ Concentraciones crecientes de TMZ (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M y 4 μ M) durante 1h.
- ❖ Pretratamiento de TRD (7,5 μ M) durante 24h y posteriormente un tratamiento de 1h a concentraciones crecientes de TMZ (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M y 4 μ M).

Después de eliminar el medio de cultivo con el tratamiento, las células fueron tripsinizadas y sembradas a baja densidad (400 células/pocillo en p6) con medio fresco. Tras 7-10 días, las células fueron teñidas con 0,5% (w/v) de cristal violeta en etanol al 70% y las colonias celulares de un área determinada fueron contadas.

3.4. Inmunofluorescencia

El ensayo de inmunofluorescencia se realizó con el objetivo de determinar la localización subcelular de la proteína FOXO3a mediante un marcaje con anticuerpos específicos en las líneas celulares LN229, U251, U87MG y en el cultivo primario P#04. Las células crecieron en cubreobjetos estériles de 13 mm de diámetro y fueron fijadas con un 4% de formaldehído antes de ser permeabilizadas con un 0,02% (v/v) de Triton X-100. Los cubreobjetos fueron bloqueados con la solución de permeabilización más un 3% de albúmina de suero bovino y, seguidamente, se le adicionó el anticuerpo contra FOXO3a (Anti-FKHRL 1/FOXO3A, Upstate) en una dilución 1/50. La tinción específica fue visualizada con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 anti-rabbit (A21206, Life technologies) y el núcleo fue marcado con DAPI (Sigma). Los cubreobjetos fueron montados con un medio de montaje (S3023, DAKO) y analizados en un microscopio confocal Zeiss con LSM con un software LSM meta 510.

3.5. Análisis estadístico

Los datos se presentan como medias \pm error estándar (SD). La significancia estadística se determinó mediante el programa GraphPad Prism, con la realización de la prueba ANOVA de un factor. Esta prueba proporciona un p-valor por cada par de conjuntos de valores comparados a través del cual podremos determinar si las diferencias son estadísticamente significativas. Éstas se indican de la siguiente manera:

- ❖ p-valor < 0,05: Diferencia significativa (*)
- ❖ p-valor < 0,01: Diferencia muy significativa (**)
- ❖ p-valor < 0,001: Diferencia extremadamente significativa (***)
- ❖ p-valor < 0,0001: Diferencia extremadamente significativa (****)

4. Resultados

4.1. Efecto de TFP, TRD y TMZ sobre la viabilidad de las líneas celulares de GBM.

Cálculo de la IC₅₀.

Con el objetivo de investigar el efecto de las fenotiazinas antipsicóticas, concretamente TFP y TRD, y de TMZ en GBM se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para ello, se realizó una curva dosis-respuesta de cada uno de los fármacos en las líneas celulares U87MG, LN229 y U251 (Figura 1).

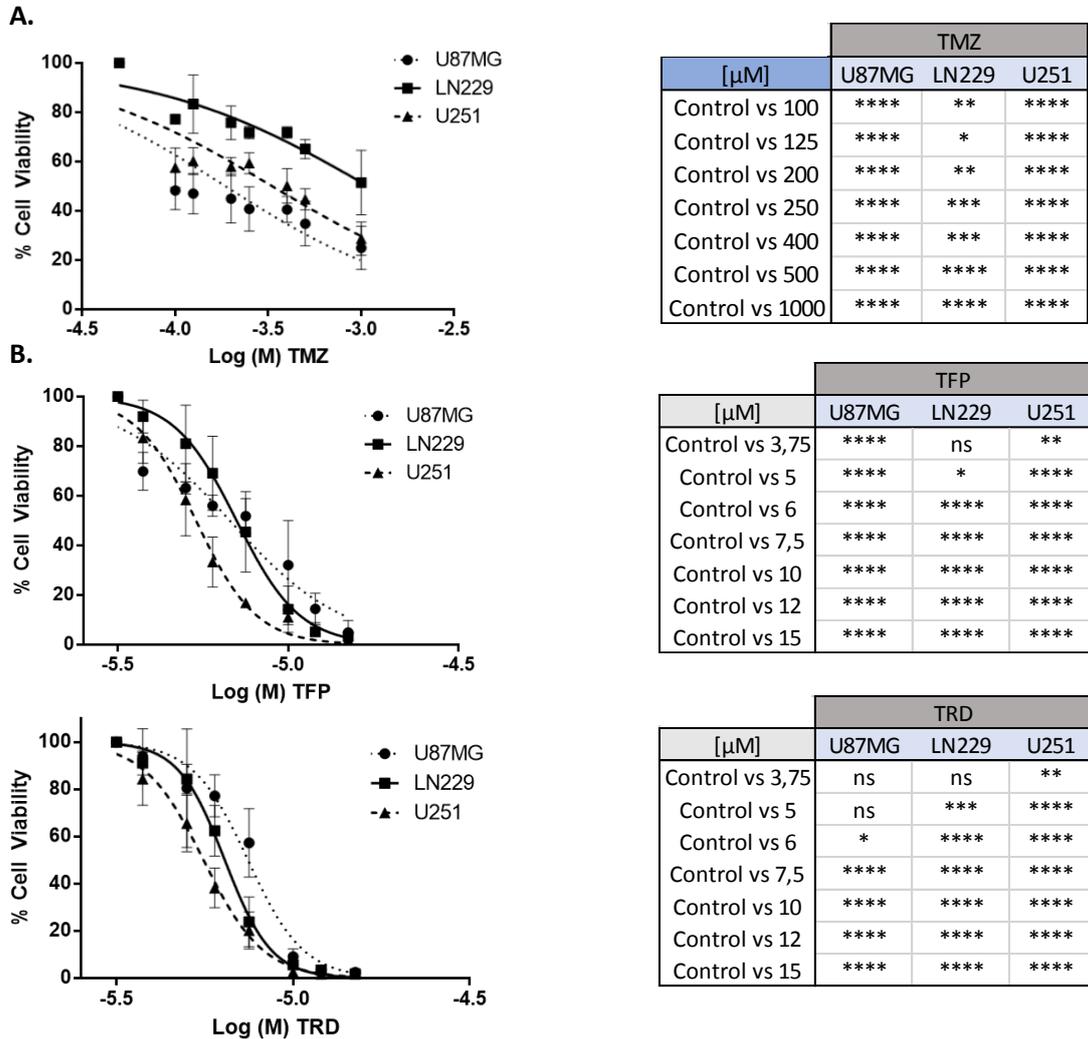


Figura 1. Gráficas de viabilidad celular de U87MG, LN229 y U251 frente a TMZ, TFP y TRD.

(A) Curvas dosis-respuesta del tratamiento con TMZ a 96h en U87MG (línea de puntos), LN229 (línea sólida) y U251 (línea de rayas). Se representa la media con el error estándar del porcentaje de viabilidad celular con respecto al logaritmo decimal de la concentración utilizada en cada caso (100 μ M, 125 μ M, 200 μ M, 250 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 1000 μ M). Cada gráfico es resultado de 4 resultados independientes. **(B)** Curvas dosis-respuesta del tratamiento con TFP y TRD a 96h en U87MG (línea de puntos), LN229 (línea sólida) y U251 (línea de rayas). Se representa la media con el error estándar del porcentaje de viabilidad celular con respecto al logaritmo decimal de la concentración utilizada en cada caso (3,75 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 12 μ M y 15 μ M). *, p-valor < 0,05; **, p-valor < 0,01; ***, p-valor < 0,001; ****, p-valor < 0,0001 (ANOVA) de cada una de las dosis con respecto el control.

En las gráficas, se representan los valores de viabilidad obtenidos en porcentaje (tomando como 100% al control) respecto del logaritmo decimal de la concentración del fármaco. Las líneas celulares U87MG, LN229 y U251 fueron tratadas con concentraciones crecientes de TMZ, TFP y TRD, y la viabilidad celular fue determinada 96 h después del tratamiento.

Los datos obtenidos muestran que el perfil de viabilidad de TFP y TRD en las 3 líneas celulares es casi idéntico, siguiendo una curva sigmoidea, mientras que la curva dosis respuesta para TMZ sigue una distribución prácticamente lineal.

De manera paralela, se determinó la IC_{50} , concentración de un compuesto necesaria para reducir la población celular al 50% (indicativo del potencial antiproliferativo del fármaco), de TMZ, TFP y TRD en las líneas celulares de GBM LN229, U251 y U87MG (**Tabla 1**).

IC_{50} (μ M)	TMZ	TFP	TRD
U87MG	186,6 \pm 51,65	6,42 \pm 0,57	7,45 \pm 0,39
U251	333 \pm 77,75	5,36 \pm 0,2	5,57 \pm 0,17
LN229	1092 \pm 472,7	7,05 \pm 0,32	6,4 \pm 0,15

Tabla 1. Valores de IC_{50} de TMZ, TFP y TRD para U87MG, U251 y LN229. Para cada fármaco, se representan las medias en μ M con sus respectivas desviaciones estándar. Se hicieron 4 experimentos independientes con TMZ y 6 experimentos independientes con TFP y TRD, sobre cada una de las tres líneas celulares.

TMZ tuvo un efecto moderado sobre las líneas celulares ya que se requirieron elevadas concentraciones para afectar a la viabilidad celular (**Figura 1A**). La línea celular más sensible a la TMZ fue U87MG, con una IC_{50} de 186,6 μ M, seguida de U251 con una IC_{50} de 333 μ M y finalmente LN229 con una IC_{50} de 1092 μ M (**Tabla 1**).

En el caso de las **fenotiazinas**, se puede observar que U251 es la línea celular más sensible tanto para TRD como para TFP ya que presenta la curva dosis-respuesta más desplazada hacia la izquierda (**Figura 1B y 1C**), indicando que es requerida una menor concentración del fármaco para afectar a la viabilidad celular. Esto se traduce en que U251 presenta los valores de IC_{50} más bajos para TFP y TRD, siendo 5,36 μ M y 5,57 μ M respectivamente (**Tabla 1**).

Las curvas correspondientes a LN229 son prácticamente idénticas, no obstante, la de TFP está un poco más desplazada hacia la derecha indicando que es menos sensible que a TRD. Por otro lado, las curvas dosis-respuesta de U87MG son bastante diferentes, siendo la de TFP prácticamente lineal. Esto último es debido a que el fármaco a concentraciones muy bajas ejercía un gran efecto (casi del 50%), el cual se mantenía en las siguientes dosis, de 3,75 μ M a 10 μ M.

4.2. Análisis de cooperación entre fármacos: TMZ con TFP o TRD.

Seguidamente se evaluaron los efectos celulares de la combinación de las fenotiazinas (TFP y TRD) con el agente quimioterapéutico utilizado actualmente en el tratamiento de los gliomas, TMZ. Con este fin, se determinó la viabilidad celular de U251 y U87MG frente a las

combinaciones de dichos fármacos y se obtuvieron los valores de IC₅₀ de los tratamientos (**Tabla 2**).

Para realizar este estudio de combinación farmacológica se probaron 9 ratios (1:1, 2:1, 1:2, 3:1, 1:3, 5:1, 1:5, 10:1 y 1:10). Dichas proporciones se calcularon a partir de los valores de IC₅₀ obtenidos en el ensayo anterior. Por ejemplo, para la combinación 1:1, se calculó el 50% de cada IC₅₀ (para TMZ y TFP, por ejemplo) y se tomaron esas nuevas concentraciones como las centrales; luego se hicieron 3 diluciones 1/2 y 3 duplicaciones, de esta manera obtuvimos 7 dosis. El mismo procedimiento se realizó para cada una de las 9 ratios.

	U251				U87MG			
	TMZ	TFP	TMZ	TRD	TMZ	TFP	TMZ	TRD
Inicial	333,00 ±	5,36 ±	333,00 ±	5,57 ±	186,60 ±	6,42 ±	186,60 ±	7,45 ±
	77,75	0,2	77,75	0,17	51,65	0,57	51,65	0,39
1:1	113,10 ±	1,81 ±	134,20 ±	2,22 ±	80,68 ±	2,75 ±	58,95 ±	2,32 ±
	34,33	0,55	39,9	0,67	28,84	0,98	20,51	0,81
2:1	159,60 ±	1,34 ±	188,40 ±	1,63 ±	39,08 ±	2,66 ±	91,79 ±	7,11 ±
	45,55	0,39	66,75	0,58	50,56	0,72	51,5	1,07
1:2	90,57 ±	2,74 ±	91,82 ±	2,96	135,40 ±	1,96 ±	160,20 ±	3,31 ±
	22,8	0,69	22,71	±0,74	10,53	0,74	40,05	3,11
3:1	77,38 ±	1,17 ±	105,70 ±	1,69 ±	88,84 ±	0,86 ±	73,64 ±	0,94 ±
	37,52	0,55	47,6	0,75	50,17	0,49	42,22	0,53
1:3	172,90 ±	1,44 ±	164,70 ±	1,42 ±	41,05 ±	4,23 ±	37,30 ±	6,09 ±
	46,75	0,39	47,65	0,41	12,55	1,29	10,31	2,28
5:1	131,60 ±	2,05 ±	203,30 ±	3,34 ±	440,40 ±	1,45 ±	347,20 ±	1,19 ±
	52,29	0,79	139,55	2,32	121,55	0,4	119,75	0,41
1:5	105,60 ±	3,29 ±	98,56 ±	3,20 ±	68,24 ±	11,46 ±	20,00 ±	4,00 ±
	18,63	0,57	18,34	0,6	13,33	2,24	16,63	2,25
10:1	105,70 ±	3,11 ±	116,10 ±	3,61 ±	390,30 ±	1,49 ±	343,50 ±	1,52 ±
	36,84	0,83	38,03	11,39	138,05	0,53	154,55	0,69
1:10	252,60 ±	2,09 ±	272,60 ±	2,34 ±	37,55	11,63	24,35 ±	8,75 ±
	52,7	0,44	77,8	0,71			5,37	1,93

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de TMZ, TFP y TRD para U87MG y U251. Para cada ratio, se representan las medias en μM con sus respectivas desviaciones estándar. Se hicieron 2 experimentos independientes con cada ratio (TMZ:TFP y TMZ:TRD) y para cada una de las dos líneas celulares (total de 72 experimentos independientes).

A continuación, se realizó un análisis isoblográfico (**Figura 2**) y se determinó el índice de combinación (CI) para cada combinación. Como podemos observar, la línea celular U251 es más sensible a las fenotiazinas que la línea celular U87MG, ya que la nueva IC₅₀ (independientemente de la ratio) no supera los 4 μM , mientras que en U87MG llega hasta 11 μM en algunas ratios. Asimismo, U251 presenta un mayor número de ratios que son sinérgicas (CI<1) o aditivas (CI=1) que U87MG. Han resultado 8 combinaciones sinérgicas para TFP y, 6 sinérgicas y 1 aditiva para TRD en U251; mientras que en U87MG, 4 sinérgicas y 1 aditiva para TFP y, 3 sinérgicas y 1 aditiva para TRD.

En U251, la ratio más sinérgica tanto para la combinación de TFP o TRD con TMZ es la 3:1 ya que presenta un CI menor, de 0,45 y 0,62 respectivamente. Por otro lado, en U87MG, la combinación más sinérgica ha resultado en ambos casos la 2:1, con un CI de 0,62 para TFP:TMZ y un CI de 0,52 para TRD:TMZ.

Finalmente, a nivel global, cabe comentar que las ratios 1:1 y 3:1 han resultado sinérgicas en todas las condiciones. Asimismo, todas las ratios que son sinérgicas en U87MG también lo han resultado para U251.

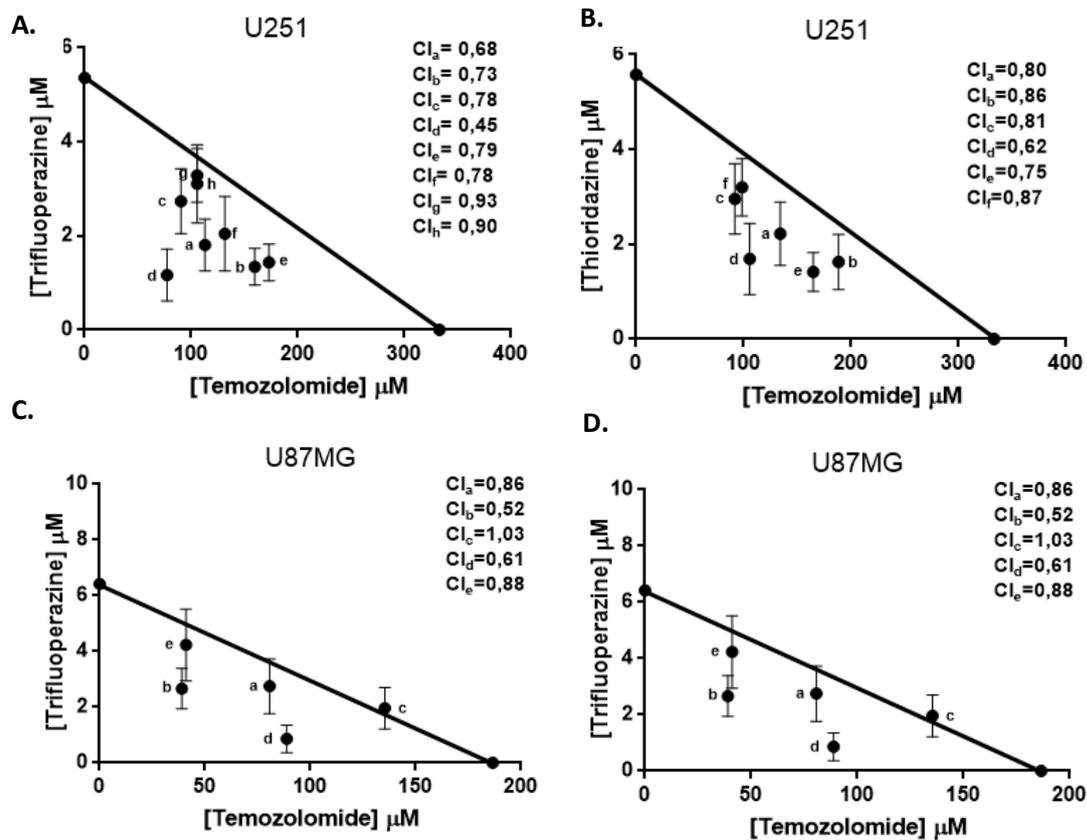


Figura 2. Efecto de las fenotiazinas antipsicóticas TFP y TRD en combinación con TMZ en líneas celulares de GBM. (A) Efecto de la combinación de TFP con TMZ en la línea celular U251 tratadas a unas ratios fijas (a=1:1, b=2:1, c=1:2, d=3:1, e=1:3, f=5:1, g=1:5, h=10:1). Los datos mostrados son las medias de dos experimentos independientes realizados por duplicado. El CI de cada combinación está indicado. **(B)** Efecto de la combinación de TRD con TMZ en la línea celular U251 tratadas a unas ratios fijas (a=1:1, b=2:1, c=1:2, d=3:1, e=1:3, f=1:5). Los datos mostrados son las medias de dos experimentos independientes realizados por duplicado. El CI de cada combinación está indicado. **(C)** Efecto de la combinación de TFP con TMZ en la línea celular U87MG tratadas a unas ratios fijas (a=1:1, b=2:1, c=1:2, d=3:1, e=1:3). Los datos mostrados son las medias de dos experimentos independientes realizados por duplicado. El CI de cada combinación está indicado. **(D)** Efecto de la combinación de TRD con TMZ en la línea celular U87MG tratadas a unas ratios fijas (a=1:1, b=3:1, c=1:3, d=1:5). Los datos mostrados son las medias de dos experimentos independientes realizados por duplicado. El CI de cada combinación está indicado.

4.3. Efecto celular y molecular de las fenotiazinas antipsicóticas en líneas celulares de GBM.

4.3.1. Estudio del crecimiento celular a largo plazo de las líneas celulares de GBM frente TMZ, TRD o la combinación de ambos.

Como se ha comentado previamente en la introducción, la terapia habitual para los pacientes con glioma implica la utilización de un agente alquilante denominado TMZ en combinación con radioterapia. En este punto de la investigación, se procedió a evaluar si las fenotiazinas antipsicóticas, concretamente TRD, podían potenciar los efectos antiproliferativos de TMZ en las líneas celulares de GBM. Para ello, se realizó un ensayo de clonogenicidad (**Figura 3**), el cual determinaría si las células cancerígenas ven afectada su capacidad clonogénica (habilidad de generar una colonia de células a partir de sucesivas mitosis) tras la exposición a un agente citotóxico. Las células que tras el tratamiento son capaces de formar colonias se denominan células supervivientes y la proporción de células supervivientes se llama fracción de supervivencia, que es lo que se cuantificó.

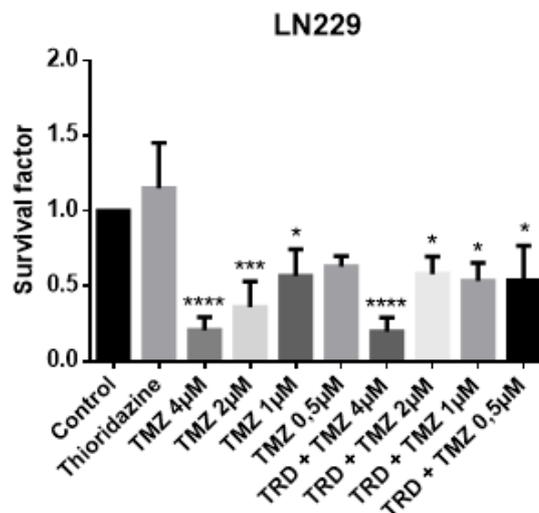


Figura 3. Fracción de supervivencia de la línea celular de GBM LN229 frente TMZ, TRD o la combinación de ambos en un ensayo clonogénico. Las células tras 24h de la siembra fueron tratadas a diferentes condiciones: una dosis fija de TRD (7,5 µM) durante 24h, concentraciones crecientes de TMZ (0,5 µM, 1 µM, 2 µM y 4 µM) durante 3h y, finalmente, un pretratamiento de TRD (7,5 µM) durante 24h y posteriormente un tratamiento de 1h a concentraciones crecientes de TMZ (0,5 µM, 1 µM, 2 µM y 4 µM). Después de los tiempos indicados, las células fueron contadas y sembradas a una dilución muy baja. Finalmente, tras 7-10 días fueron teñidas como se indica en los materiales y métodos. Se muestran las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes, donde cada condición se realizó por duplicado. Las diferencias entre los tratamientos combinados o los tratamientos por separado son estadísticamente diferentes indicados como * p-valor < 0,05, **p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,001, ****p-valor < 0,0001.

Los resultados obtenidos muestran como una corta exposición a TMZ (3h) compromete dramáticamente la capacidad clonogénica de las células de una manera dosis-dependiente,

siendo máxima a 4 μ M. Se observa el mismo patrón de crecimiento independientemente de si el tratamiento con TMZ se ha realizado solo o en combinación con TRD. No obstante, no se detectan cambios significativamente diferentes entre la condición control y el tratamiento con TRD. De hecho, a nivel cualitativo, las colonias formadas eran más grandes y, por consecuencia, su tinción era más intensa (**Figura 4**).

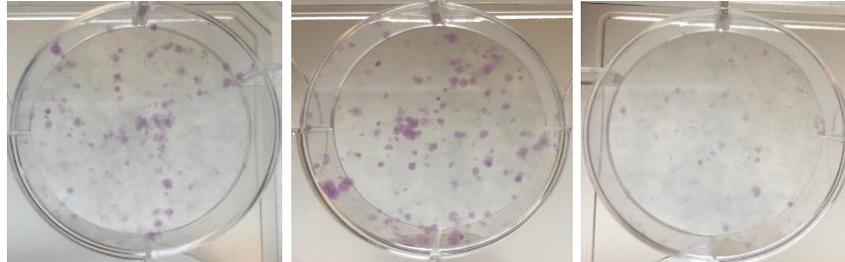
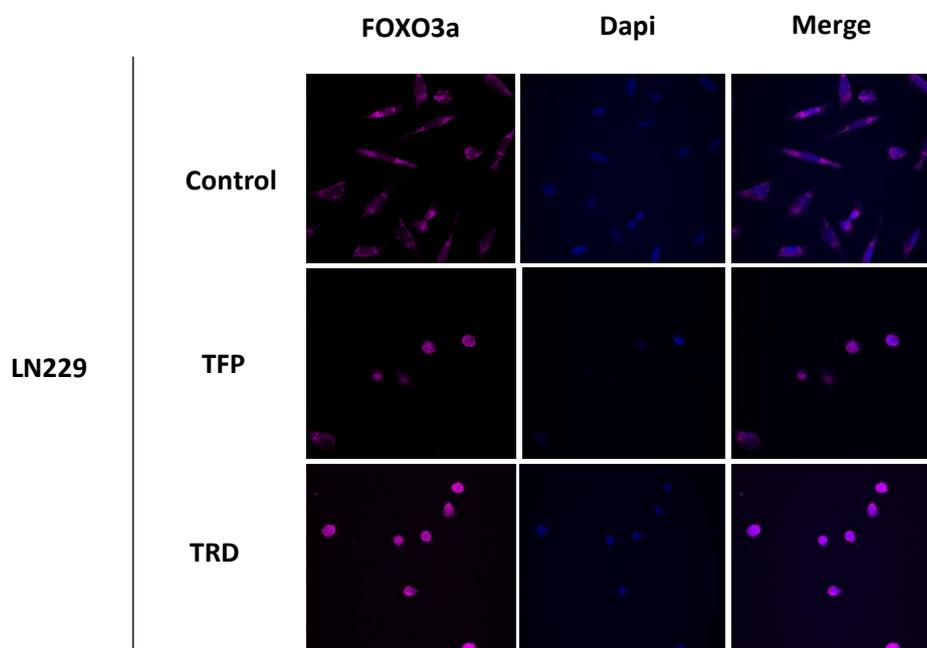


Figura 4. Imágenes de las colonias celulares tras la tinción cristal violeta. En la figura se muestra la condición control, el tratamiento de TRD y el tratamiento más efectivo de TMZ (4 μ M) respectivamente.

4.3.2. Estudio de la localización intracelular de FOXO3a en líneas celulares de GBM y cultivos primarios en respuesta a un tratamiento con fenotiazinas antipsicóticas.

Finalmente, se pretendió analizar uno de los posibles efectos moleculares de las fenotiazinas antipsicóticas, concretamente su acción en el control del exporte nuclear de FOXO3a ya que su localización subcelular es esencial para su función. Para ello, 3 líneas celulares de GBM (LN229, U251 y U87MG) y un cultivo primario (P#04) fueron tratados a una concentración fija y, posteriormente, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con microscopía confocal.

Las imágenes presentadas en la **Figura 5**, demuestran claramente que FOXO3a se transloca del citoplasma al núcleo en respuesta a TFP y TRD.



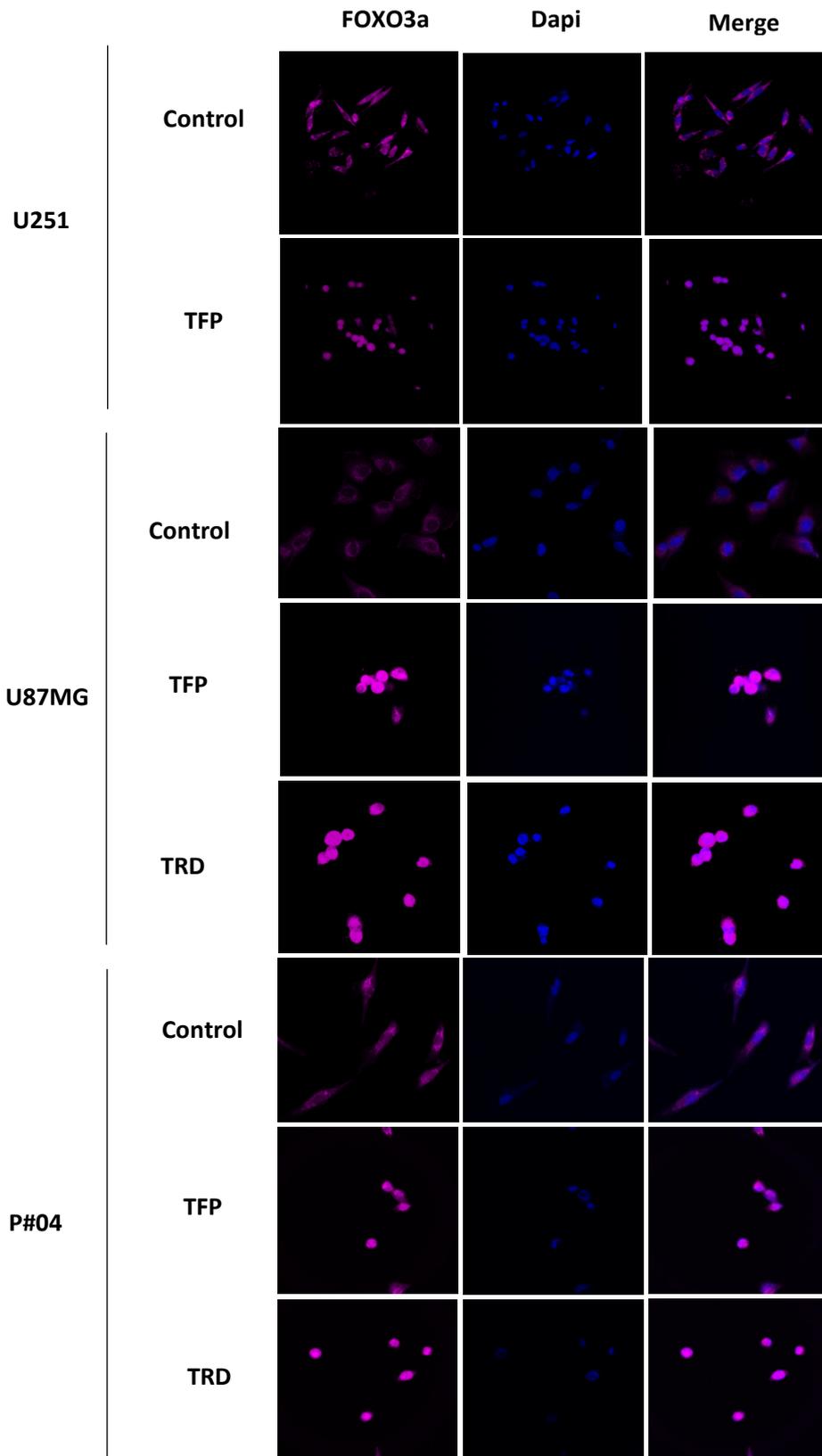


Figura 5. Efecto de las fenotiazinas antipsicóticas sobre la distribución de FOXO3a en LN229, U251, U87MG y en un cultivo primario. Tinción inmunofluorescente de FOXO3a en LN229, U87MG y P#04 tras un tratamiento de 1 hora de TFP y TRD a 20 μ M y 10 μ M respectivamente. Para la línea celular U251 se realizó un tratamiento único con TFP a 12,5 μ M.

Se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia de FOXO3a nuclear (datos no mostrados) a partir de las imágenes de la **Figura 5**, y se determinó que todas las líneas celulares tratadas con TFP y TRD presentaban un incremento de la señal de FOXO3a nuclear entre 2 y 3 veces con respecto a las células control.

5. Discusión

El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos implica un elevado gasto de recursos, tiempo y esfuerzo, por lo que la reutilización de los fármacos constituye una nueva y potencial estrategia terapéutica. Las fenotiazinas se han utilizado como fármacos antipsicóticos durante décadas, asimismo, ha sido reportado que presentan efectos antitumorales tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la modulación de varias vías de señalización¹⁹. En el presente trabajo, se pretendió caracterizar el efecto molecular de dos fenotiazinas antipsicóticas (TFP y TRD) en líneas celulares de GBM, así como estudiar el potencial papel cooperativo con el actual agente quimioterapéutico de este tumor tan agresivo, la temozolomida.

En tres líneas celulares de GBM (LN229, U87MG y U251) hemos demostrado que tanto TFP, TRD como TMZ disminuyen marcadamente la viabilidad celular a 96h (**Figura 1**). Esto coincide con resultados previos del grupo de investigación, que demuestran que las fenotiazinas disminuyen la viabilidad celular a 48h. Los valores de IC₅₀ del presente trabajo (**Tabla 1**) son inferiores a los que se obtuvieron a 48h como es lógico tras una menor exposición al compuesto.

Algunos estudios han descrito que el efecto citotóxico de las fenotiazinas es debido a los grupos funcionales unidos al anillo tricíclico de la molécula (-SCH₃ de Tioridazina y -CF₃ de trifluoperazina). Asimismo, también se ha comprobado que modificando la longitud de la cadena aminoalquilo y cambiando el tipo de amina terminal se potencia la actividad anticancerígena de los fármacos²⁰. Todos estos conocimientos moleculares se han demostrado en células leucémicas, donde se comprobó que un tratamiento con fenotiazinas producía un importante efecto citotóxico y antiproliferativo. Además, se determinó que el rango de concentración que conllevaba un mayor efecto oscilaba entre 5-10 μM, el cual coincide con el obtenido en el presente trabajo, para GBM²¹.

Con respecto a la TMZ, en la literatura científica hay mucha confusión y variabilidad de valores de IC₅₀ en función de la línea celular de GBM y la duración del tratamiento, no obstante, todos coinciden que la IC₅₀ de TMZ está comprendida entre 10 μM y 1000 μM²². Los sucesivos experimentos de combinación de fármacos se realizaron únicamente con U87MG y U251 ya que la IC₅₀ de LN229 era muy elevada (1092 μM) y estaba en el límite del intervalo previamente mencionado.

Una vez bien caracterizados los patrones de viabilidad de los compuestos por separado, se procedió a realizar el ensayo de combinación de TMZ con las fenotiazinas. En la actualidad se están realizando estudios y ensayos clínicos en pacientes con GBM probando la combinación de TMZ con otros compuestos, como Bortezomib²³, TN-TC11G²⁴ y Baviximab²⁵, no obstante, ningún estudio se ha realizado con fenotiazinas hasta la fecha.

En las líneas celulares U87MG y U251, los resultados obtenidos son bastante prometedores ya que se ha demostrado que, tanto TFP como TRD ejercen un efecto sinérgico con TMZ, a ciertos ratios (**Figura 2**). Se plantean diversas hipótesis que expliquen estos resultados, como que las

fenotiazinas antipsicóticas sensibilicen a la célula y las hagan más vulnerables al efecto de la TMZ o bien, que potencien el efecto de la TMZ.

Esta última idea se fundamenta en algunas investigaciones que demuestran que algunos compuestos antipsicóticos, como la TFP, inhiben los mecanismos de reparación del DNA^{26,27} dificultando la reparación de las roturas de las dos hebras de DNA (DBS) que aparecen al no eliminarse los grupos metilo añadidos por la TMZ²⁸. No obstante, los resultados obtenidos en el ensayo de clonogenicidad rechazarían esta hipótesis porque a largo plazo no se observan diferencias entre el tratamiento de TMZ solo o con las fenotiazinas antipsicóticas (**Figura 3**).

Asimismo, este experimento nos demuestra que el efecto de las fenotiazinas antipsicóticas sobre las células cancerosas no es permanente, es decir que una vez que se deja de administrar el fármaco las células recuperarían su funcionalidad maligna completa (**Figura 4**). En contraposición, con un tratamiento de apenas de unas horas, la TMZ compromete la inmortalidad replicativa de las células (se forman menos colonias y más pequeñas) ya que, como se ha descrito con anterioridad, afecta al DNA nuclear.

Finalmente, se evaluó el papel del factor de transcripción FOXO3a en respuesta a las fenotiazinas antipsicóticas. Como se ha comentado en la introducción, la vía de señalización PI3K/AKT se encuentra hiperactivada en GBM y, por ello, se supone que FOXO3a se encuentra inactivado. De hecho, se ha demostrado que la expresión de FOXO3a está directamente correlacionada con el grado malignidad del glioma, porque se ha visto que los pacientes con un peor pronóstico son los que presentan niveles más bajos de FOXO3a²⁹.

Diferentes compuestos químicos han sido descritos como activadores de FOXO3a y FoxO1 favoreciendo su importación nuclear, de entre los que destacan las fenotiazinas, en líneas celulares de adenocarcinoma de riñón, en células endoteliales³⁰ y en líneas celulares de cáncer de mama³¹. Los resultados (**Figura 5**) muestran claramente como un tratamiento de TFP y TRD de 1h promueve la acumulación nuclear de FOXO3a en las 3 líneas celulares de GBM y en células derivadas de una muestra de paciente. Se postula que el mecanismo por el cual se produce esta relocalización es a través de calmodulina³², no obstante, se requieren experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

Es por todo ello que el tratamiento coadyuvante con fenotiazinas, fármacos aprobados para su uso en la clínica, constituye una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de los pacientes con GBM. Asimismo, sería interesante que esta línea de investigación continuase adelante para dilucidar con más detalle los mecanismos moleculares implicados, con el objetivo final de sentar las bases para el diseño e implementación de un ensayo clínico.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de este trabajo son:

1. Las fenotiazinas antipsicóticas (TFP y TRD) y el fármaco alquilante TMZ disminuyen la viabilidad celular de las líneas celulares de GBM (U87MG, LN229 y U251).
2. Las fenotiazinas probadas presentan una IC₅₀ del orden de 5-7,5 µM sin diferencias significativas entre las líneas celulares. Por otro lado, la TMZ presenta una IC₅₀ comprendida en un rango más amplio, siendo la línea celular U87MG la más sensible (186 µM) y la línea celular LN229 la más resistente (1092 µM).

3. En U87MG y U251, la combinación de TMZ con TFP o TRD ha resultado sinérgica en un gran número de combinaciones, siéndolo siempre a las ratios 3:1 y 1:1. Asimismo, todas las ratios que son sinérgicas para U87MG lo son para U251, tanto para TFP como para TRD.
4. A largo plazo, únicamente el tratamiento con TMZ compromete la capacidad de formación de las colonias de LN229. La TRD, sola o con TMZ, no ejerce ningún efecto citotóxico permanente sobre las células cancerosas.
5. TFP y TRD promueven la importación nuclear de FOXO3a en las líneas celulares U87MG, LN229, U251 y en cultivos primarios.

6. Bibliografía

1. Mesfin, F. B. & Al-Dhahir, M. A. *Cancer, Brain, Gliomas. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722904>>
2. Paolillo, M., Boselli, C. & Schinelli, S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Brain Sci.* **8**, (2018).
3. Langhans, J. *et al.* The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour. *Oncogenesis* **6**, 398 (2017).
4. Santo, E. E. *et al.* FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma. *Cancer Res.* **73**, 2189–98 (2013).
5. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. & Rishi, A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1978–1986 (2011).
6. Xu, K. *et al.* FoxO3a induces temozolomide resistance in glioblastoma cells via the regulation of β -catenin nuclear accumulation. *Oncol. Rep.* **37**, 2391–2397 (2017).
7. Lubanska, D. & Porter, L. Revisiting CDK Inhibitors for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Drugs R. D.* **17**, 255–263 (2017).
8. Jiang, W. *et al.* Repurposing phenformin for the targeting of glioma stem cells and the treatment of glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 56456–56470 (2016).
9. Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L. & Rich, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* **29**, 1203–17 (2015).
10. Tan, S. K. *et al.* Drug Repositioning in Glioblastoma: A Pathway Perspective. *Front. Pharmacol.* **9**, 218 (2018).
11. Ozdemir-Kaynak, E., Qutub, A. A. & Yesil-Celiktas, O. Advances in Glioblastoma Multiforme Treatment: New Models for Nanoparticle Therapy. *Front. Physiol.* **9**, 170 (2018).
12. Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K. & González-Méndez, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ. Química* **27**, 286–291 (2016).
13. Lee, J.-K., Nam, D.-H. & Lee, J. Repurposing antipsychotics as glioblastoma therapeutics: Potentials and challenges. *Oncol. Lett.* **11**, 1281–1286 (2016).
14. Tan, S. K. *et al.* Drug Repositioning in Glioblastoma: A Pathway Perspective. *Front. Pharmacol.* **9**, 218 (2018).
15. Barak, Y., Achiron, A., Mandel, M., Mirecki, I. & Aizenberg, D. Reduced cancer incidence among patients with schizophrenia. *Cancer* **104**, 2817–2821 (2005).

16. Lee, J.-K., Nam, D.-H. & Lee, J. Repurposing antipsychotics as glioblastoma therapeutics: Potentials and challenges. *Oncol. Lett.* **11**, 1281–1286 (2016).
17. Kang, S. *et al.* Trifluoperazine, a Well-Known Antipsychotic, Inhibits Glioblastoma Invasion by Binding to Calmodulin and Disinhibiting Calcium Release Channel IP3R. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 217–227 (2017).
18. Cheng, H.-W. *et al.* Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. *Cell Death Dis.* **6**, e1753 (2015).
19. Wu, C.-H. *et al.* Pharmacological exploitation of the phenothiazine antipsychotics to develop novel antitumor agents—A drug repurposing strategy. *Sci. Rep.* **6**, 27540 (2016).
20. Jaszczyszyn, A. *et al.* Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Reports* **64**, 16–23 (2012).
21. Zhelev, Z. *et al.* Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **53**, 267–275 (2004).
22. Shen, W., Hu, J.-A. & Zheng, J.-S. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *J. Int. Med. Res.* **42**, 164–172 (2014).
23. Haukeland University Hospital. Bortezomib and Temozolomide in Recurrent Glioblastoma With Unmethylated MGMT Promoter (BORTEM-17).
24. Grupo Español de Investigación en Neurooncología. TN-TC11G (THC+CBD) Combination With Temozolomide and Radiotherapy in Patients With Newly-diagnosed Glioblastoma.
25. Massachusetts General Hospital. Baviximab With Radiation and Temozolomide for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma.
26. Polischouk, A. G. *et al.* The antipsychotic drug trifluoperazine inhibits DNA repair and sensitizes non small cell lung carcinoma cells to DNA double-strand break induced cell death. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2303–2309 (2007).
27. Gangopadhyay, S., Karmakar, P., Dasgupta, U. & Chakraborty, A. Trifluoperazine stimulates ionizing radiation induced cell killing through inhibition of DNA repair. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **633**, 117–125 (2007).
28. Wang, H. *et al.* Temozolomide-mediated DNA methylation in human myeloid precursor cells: differential involvement of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2699–709 (2013).
29. Shi, J. *et al.* Clinical and biological significance of forkhead class box O 3a expression in glioma: mediation of glioma malignancy by transcriptional regulation of p27kip1. *J. Neurooncol.* **98**, 57–69 (2010).
30. Kau, T. R. *et al.* A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* **4**, 463–476 (2003).
31. Park, S. *et al.* Pharmacological activation of FOXO3 suppresses triple-negative breast cancer in vitro and in vivo. **7**,
32. Berchtold, M. W. & Villalobo, A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 398–435 (2014).