



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Análisis del potencial de nuevas estrategias terapéuticas en Gliomas.

Fernando Unzueta Payeras

Grado de Bioquímica

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 43204880R

Trabajo tutelado por Priam Villalonga Smith
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut



Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo:
Glioma, Temozolomida, Trifluoperazina

RESUMEN

Los gliomas son el principal tipo de tumor cerebral primario, siendo el glioblastoma multiforme el más común de todos. Los glioblastomas son muy agresivos y tienen muy mal pronóstico, puesto que no hay un tratamiento eficaz que aumente la baja esperanza de vida de los pacientes, que es de unos 9 a 14 meses. Uno de los principales problemas en el tratamiento de estas neoplasias es que el compuesto utilizado debe atravesar la barrera hematoencefálica hecho que restringe mucho el fármaco utilizado. La Trifluoperazina es un antipsicótico que pertenece al grupo de las fenotiazinas y que se ha visto en algunos estudios que posee un cierto potencial antitumorigénico. El objetivo del presente trabajo es analizar el potencial terapéutico del tratamiento actual utilizado en glioblastomas: la Temozolomida, al combinarla con Trifluoperazina. Con la combinación de ambos fármacos se obtuvo un buen efecto terapéutico en dos líneas celulares de glioblastoma diferentes: LN229 y U87MG. La disminución de la viabilidad celular en ambos modelos celulares con el tratamiento con Trifluoperazina y Temozolomida fue considerablemente mayor que con el tratamiento convencional.

ABSTRACT

Gliomas are the main type of primary brain tumours. Of these, glioblastomas are the most common. It is a very aggressive type of cancer, having a dire prognosis, due to the lack of efficient treatment, rendering the patients a life span of 9 to 14 months. The main problem faced by the new therapies for the brain neoplasia is the blood brain barrier, which limits its effectiveness and the type of drug. Trifluoperazine is an antipsychotic drug from the phenothiazine group, which in previous studies has shown to have a certain antitumor effect. The objective of the present work is to analyse the therapeutic potential of combining the current glioblastoma treatment, Temozolomide, with another molecule, Trifluoperazine. A favourable effect was observed with this combination of drugs on cultures from two different glioblastoma cell lines: LN229 and U87MG. Cell viability in both cellular types treated with the combined Temozolomide-Trifluoperazine drugs was significantly lower than that of the conventional treatment.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Los gliomas: clasificación e incidencia	4
1.2 El Glioblastoma multiforme: tipos y alteraciones moleculares	5
1.2 Vía PI3K/Akt.....	6
1.3 Factores de transcripción FoxO	6
1.4 Tratamiento	7
1.5 Temozolomida	8
1.6 Trifluoperazina.....	9
2. OBJETIVO.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Cultivos celulares y reactivos	10
3.2 Ensayos de viabilidad celular	10
3.3 Análisis de actividad caspasa	11
3.4 Análisis de apoptosis por citometría.....	12
3.5 Análisis de proteínas relacionadas con el ciclo celular y apoptosis por Western Blot	13
3.6 Ensayos de clonogenicidad.....	14
3.8 Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS	17
4.1 Cálculo de la IC ₅₀ de la Temozolomida y de la Trifluoperazina	17
.....	17
4.2 Análisis de cooperación entre los dos fármacos	18
4.3 Efectos sobre la actividad apoptótica de Trifluoperazina y Temozolomida.....	20
4.4 Análisis por Western Blot de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular y respuesta al daño en el ADN	23
4.5 Ensayo de clonogenicidad	24
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFIA	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los gliomas: clasificación e incidencia

Los gliomas son neoplasias del sistema nervioso central que se originan a partir de células de la glía: astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos¹. Hay diversos tipos y se pueden clasificar según criterios histológicos e inmunohistoquímicos, pudiendo distinguir: astrocitomas, ependimomas, oligodendrocitomas y oligoastrocitomas, si presentan características morfológicas tanto de astrocito como oligodendrocito²⁻⁴.

La clasificación utilizada actualmente es la de la Organización Mundial de la Salud, publicada en 1979 y cuya versión más actual es la de 2007². Para su clasificación, además de características histológicas se utilizan otros parámetros patológicos como por ejemplo alteraciones genéticas, pudiendo ubicar cada tumor en una escala del I al IV en función del comportamiento biológico que tendrá. Se usan criterios como: el aumento de la densidad celular, alteraciones en el núcleo, mitosis, proliferación vascular y necrosis⁵. Se podría definir como una escala de malignidad: el grado I presenta un bajo potencial proliferativo y se puede tratar con una extracción quirúrgica, el grado II tiene una actividad proliferativa baja pero con tendencia a infiltrarse a estructuras colindantes, el grado III conlleva una mayor malignidad con un aumento de la proliferación y la anaplasia, y finalmente el grado IV, que es el más elevado de todos y presenta mayores características de malignidad, como un crecimiento completamente descontrolado, angiogénesis, necrosis, mayor resistencia a tratamientos de quimioterapia/radioterapia y generalmente son letales en un periodo de 12 meses^{2,3}.

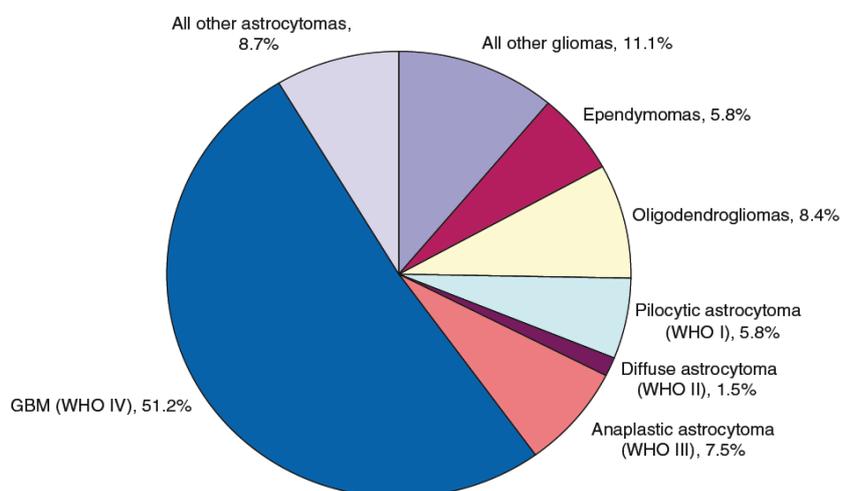


Figura 1. Incidencia de los distintos tipos de glioma.
Extraído de ⁴

Según la Asociación Española Contra el Cáncer la incidencia anual de tumores malignos primarios del sistema nervioso central en hombres es de 8.73 por cada 100.000 habitantes y en mujeres de 5.41 de cada 100.000 personas⁶. En los Estados Unidos la incidencia anual es de 9 personas de cada 100.000 y los gliomas representan casi el 80% de los tumores cerebrales primarios⁷. El tipo de glioma con mayor incidencia es el astrocitoma, aproximadamente un 75% de todos los casos de glioma, siendo el más frecuente el glioblastoma (51.2%) (Figura 1) ⁴.

1.2 El Glioblastoma multiforme: tipos y alteraciones moleculares

El glioblastoma multiforme (GBM) puede dividirse en dos tipos dependiendo de su presentación clínica: primario si surge de *novo* o secundario si proviene de la evolución de astrocitomas de menor grado. El primario es el más frecuente en pacientes de edad más avanzada, mientras que el secundario tiene mayor incidencia en pacientes menores de 45 años. Pese a tener un origen clínico distinto (figura 2) son morfológica y clínicamente indistinguibles.

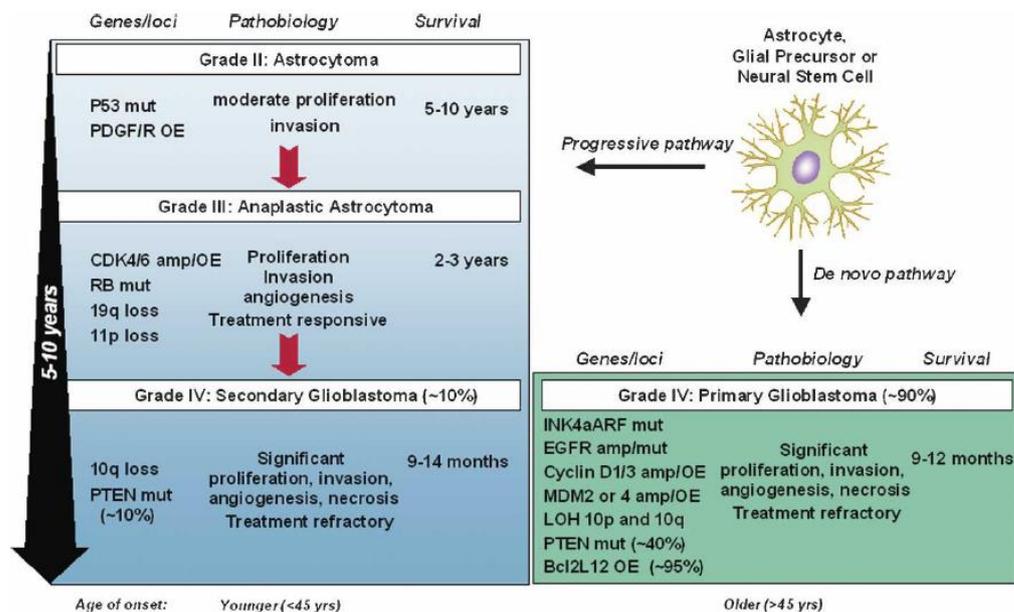


Figura 2. Origen clínico del GBM. Origen de los dos tipos de GBM incluyendo los genes afectados, la patología y el tiempo de supervivencia del paciente. Extraído de ⁴

Hay cierta correlación entre algunas mutaciones y el tipo de GBM, en glioblastomas secundarios son más frecuentes las mutaciones en el gen de p53, que se activa frente a situaciones de estrés como el daño en el ADN⁷. Por otra parte las mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tienen una mayor incidencia en los glioblastomas primarios (40-60%), en los secundarios es menor que el 10%^{4,7}.

1.2 Vía PI3K/Akt

La hiperactivación de EGFR es uno de los factores importantes en la sobreestimulación de la vía PI3K/Akt (figura 3). Esta vía de señalización se inicia con la activación de un receptor con actividad tirosina quinasa intrínseca, como EGFR. La unión ligando-receptor permite que se reclute, gracias a proteínas adaptadoras, la Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) que fosforila al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) produciendo PIP₃. PIP₃ puede reclutar y activar diversas proteínas efectoras como PDK1, que activa a AKT mediante dos fosforilaciones en la treonina

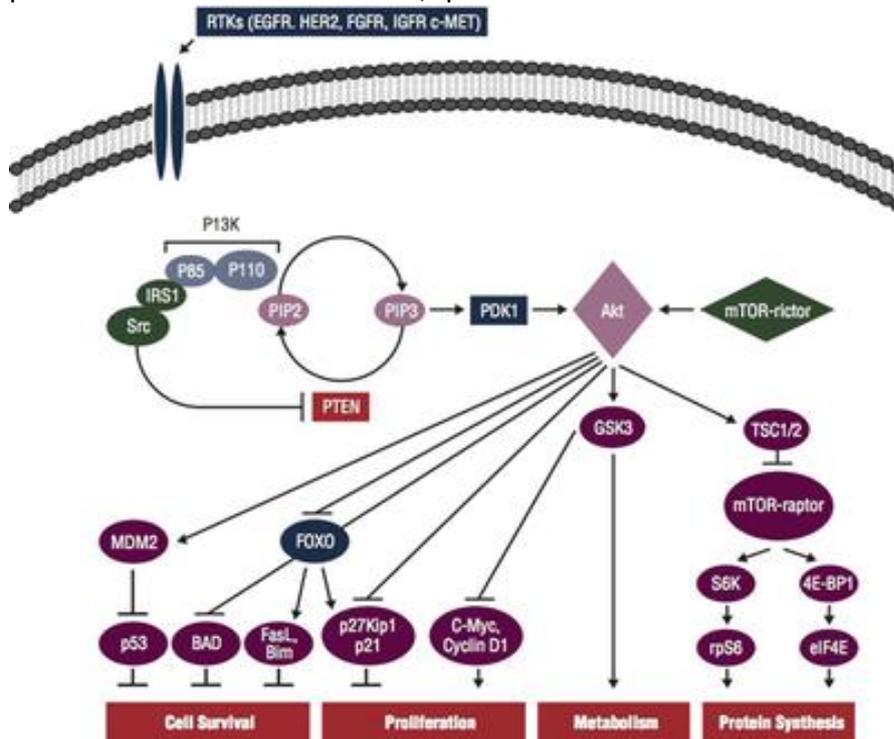


Figura 3. Vía PI3K/Akt. Extraído de ⁴¹

308 y en la serina 473. Akt fosforila proteínas que se encuentran involucradas con procesos como la regulación del crecimiento celular, la proliferación, el metabolismo y la apoptosis^{3,4}.

PTEN es un supresor tumoral que en el 50% de gliomas de alto grado se encuentra

inhibido. Se trata de una fosfatasa que desfosforila a PIP₃, de modo que reduce la activación de la vía PI3k/Akt. Las células en estado de quiescencia acumulan grandes cantidades de PTEN, y su ausencia favorece que se acumule el PIP₃, potenciando así la sobreactivación de la vía PI3K/Akt y sus consecuencias sobre el crecimiento celular³.

Además de esta vía, hay otras que pueden estar desreguladas en gliomas como: la MAPK, RB y p53³.

1.3 Factores de transcripción FoxO

Los factores de transcripción Fox (*forkhead box*) se caracterizan por presentar un dominio de unión al ADN de 110 aminoácidos llamado *forkhead* o *winged-helix*^{8,9}. Hay más de 100 proteínas que forman parte de esta superfamilia de factores de transcripción y se organizan

en clases, desde FoxA hasta FoxR⁹. Los miembros de la clase O tienen la característica de que están regulados por la vía de señalización insulina/PI3K/Akt⁹. Forman parte de esta clase: FoxO1, FoxO3a, FoxO4 y FoxO6, de los cuales FoxO1 y FoxO3a se han encontrado en todos los tejidos⁸. Estos factores de transcripción poseen un rol importante en el control de la proliferación, apoptosis, autofagia, metabolismo, inflamación, diferenciación y resistencia al estrés^{8,9}.

Cuando Akt se encuentra activada inhibe los factores de transcripción FoxO1 y FoxO3a, ya que la fosforilación de estos factores de transcripción por parte de Akt produce su salida del núcleo y su posterior degradación en el citoplasma³.

FoxO1 y FoxO3a tienen un papel importante en la carcinogénesis, puesto que actúan como supresores tumorales. En determinados procesos tumorales se produce una mutación en FoxO1⁸. La activación de FoxO3a permite una mayor expresión de proteínas como p21 y p27 que favorecen un arresto del ciclo celular en fase G1/S. En diversos tipos de cánceres, como cáncer de mama, leucemia, cáncer de próstata o glioblastoma, se ha observado una desregulación de FoxO3a⁹.

Así como estos factores de transcripción Fox de la clase O pueden actuar como supresores tumorales, otros en cambio, como es el caso de FoxM1 (Fox de la clase M 1) que puede actuar como oncogén, promoviendo la proliferación, un aumento de la respuesta al daño en el ADN, angiogénesis, migración e invasión y la senescencia. Se ha observado una sobreexpresión de FoxM1 en diversos procesos tumorales y actualmente se plantea como diana terapéutica. FoxO3a puede actuar como un inhibidor de la expresión de FoxM1 y al estar reducido por la sobreactivación de la vía PI3K/Akt los niveles de FoxM1 se encuentran aumentados ¹⁰.

1.4 Tratamiento

El tratamiento del glioblastoma es complejo, ya que después de la cirugía para extirpar la mayor parte posible del tumor, éste, con el paso del tiempo se vuelve a manifestar en más de un 95% de los casos. La cirugía se complementa con radioterapia o quimioterapia. El tratamiento estándar es Temozolomida administrada concomitantemente con radioterapia^{4,11}. El principal problema que presenta la quimioterapia en gliomas es que el fármaco debe ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro, y tan

solo moléculas lipofílicas pequeñas pueden hacerlo, hecho que restringe mucho los agentes citotóxicos utilizables¹²

1.5 Temozolomida

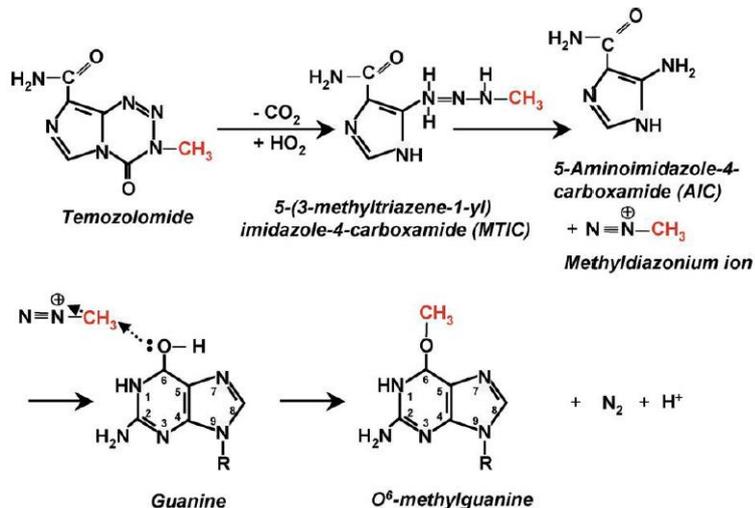


Figura 4. Transformación de la TMZ y metilación de la Guanina. Extraído de¹⁵

La Temozolomida (TMZ) es un agente alquilante cuyo fin inicial era el tratamiento de melanomas que por metástasis hubieran afectado al cerebro, pero también se observó que era eficaz en glioblastomas recurrentes. Una característica fundamental de la Temozolomida es que puede atravesar la barrera

hematoencefálica y tiene una absorción oral rápida y casi total, produciéndose el pico de máxima concentración en sangre entre 30 y 90 minutos después de su consumo¹³. Una vez es absorbida, se convierte en MTIC que rápidamente es transformado en AIC (compuesto inactivo) y en metildiazol que transfiere un grupo metilo al ADN (*figura 4*)¹⁴. El ADN se puede alquilar en el N⁷ ($\geq 70\%$) y O⁶ (5%) de la guanina, y en el N³ (9%) de la adenina. Aunque la alquilación de la guanina en el O⁶ solo represente un 5% de las lesiones inducidas en el ADN por la Temozolomida, éstas conducen a una rotura en el ADN, que si no es reparada, activa la vía de la apoptosis y/o autofagia^{13,12,14,15}. Hay un enzima que es capaz de reparar el daño producido en el O⁶ de la guanina, se trata de la O⁶-metilguanina-ADN metil transferasa (MGMT). Una elevada expresión de este enzima reduce la efectividad del tratamiento con Temozolomida, incluso puede otorgar a algunos tumores resistencia a este fármaco. En cambio si el promotor del gen de la MGMT se encuentra metilado, la expresión de la proteína disminuirá, aumentando así la citotoxicidad de la Temozolomida¹³⁻¹⁷. En aproximadamente el 50% de GBM el promotor del gen de la MGMT está metilado y por tanto tienen una mayor sensibilidad a agentes alquilantes como la Temozolomida¹³.

1.6 Trifluoperazina

La Trifluoperazina (*figura 5*) es un fármaco que pertenece al grupo de las fenotiazinas, se clasificaría como un antipsicótico típico o de primera generación. Este fármaco se empezó a utilizar a partir de la década de los 50 para el tratamiento de la esquizofrenia¹⁸. Las fenotiazinas también se podían utilizar como antieméticos, por

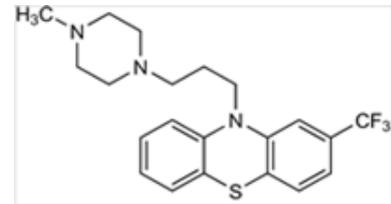


Figura 5. Estructura molecular de la TFP. Extraído de¹⁹

ejemplo, para calmar los vómitos frecuentes de los postoperatorios. El efecto antipsicótico se produce gracias a la actuación como antagonistas del receptor de dopamina D₂, y el efecto antiemético se origina al funcionar también como antagonistas de receptores de serotonina^{19,20}. Además de estos efectos, las fenotiazinas se han probado sobre líneas celulares tumorales y han mostrado un cierto potencial citotóxico o citostático dependiendo de la línea o del contexto celular, aunque el mecanismo completo es desconocido¹⁹. La Trifluoperazina ha mostrado inhibir la exportación del núcleo de FoxO1, hecho que puede explicar el potencial antitumoral²¹.

2. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es evaluar en dos líneas celulares de glioblastoma el potencial terapéutico que tiene la combinación de Temozolomida y Trifluoperazina. Para ello se pretendió analizar diversos parámetros como la viabilidad, la apoptosis y la clonogenicidad, para así poder evaluar in vitro el efecto que tiene sobre el glioblastoma la combinación de estos dos fármacos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares y reactivos

En este estudio se utilizaron como modelo experimental dos líneas celulares de glioblastoma:

- **U87MG:** Derivadas de un hombre caucásico de 44 años²². Contiene una mutación en PTEN²³.
- **LN229:** Fue establecida en 1979, procede de una mujer caucásica de 60 años. Presenta una mutación de p53 y una delección en p16²⁴.

Ambas líneas se han cultivado en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino 10% y con los antibióticos penicilina-estreptomicina. Las condiciones del incubador fueron: 37 °C y 5% CO₂. Para realizar los lavados se utilizó PBS (Phosphate Buffered Saline) y para separar las células de la placa de cultivo se utilizó tripsina. Todos estos productos utilizados son de la casa comercial Sigma-Aldrich®.

Los dos fármacos utilizados para la realización de este trabajo son la Temozolomida (TMZ) y la Trifluoperazina (TFP), ambos han sido comprados a la casa comercial Sigma-Aldrich®.

3.2 Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular fueron necesarios tanto para el cálculo de la IC₅₀ de los dos fármacos como para el estudio de cooperación de éstos. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, en las cuales primero se siembran 4000 células por pocillo. 24 horas después de la siembra se trata cada pocillo con la concentración de fármaco que corresponde:

- Curva dosis-respuesta de Temozolomida: 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µM de TMZ.
- Curva dosis-respuesta de Trifluoperazina: 1, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 y 30 µM de TFP.
- Análisis de cooperación: A cada dosis de TMZ utilizada se le añade una fija de TFP.
 - TMZ: 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µM
 - TFP: + 5 µM , +7.5 µM y +10 µM

Cada condición se analiza por triplicado y se utilizan tres pocillos sin tratar como control.

Tras 48 horas de tratamiento se realiza el ensayo de viabilidad celular, utilizando para ello el kit *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay* de Promega[®]. Este kit permite determinar las células viables que hay en un cultivo mediante la cuantificación del ATP.

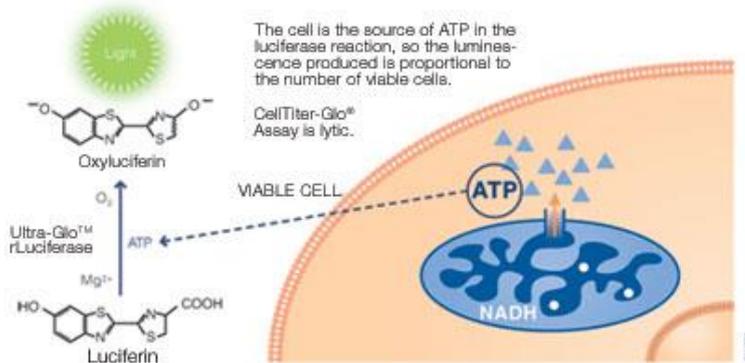


Figura 6. Funcionamiento del kit CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay. Extraído de ³⁹

El reactivo produce la lisis celular y permite liberar el ATP del interior de la célula produciendo una señal lumínica proporcional al número de células viables presentes en el cultivo²⁵. Esta señal lumínica se genera gracias a una luciferasa termoestable tal y como se observa en la *figura 6*.

La señal lumínica se cuantificó utilizando el *Synergy MX Microplate reader* de Biotek[®]. La viabilidad se representó en porcentaje respecto al control.

3.3 Análisis de actividad caspasa

El análisis de la actividad caspasa se realizó con el fin de poder determinar si los fármacos inducían la apoptosis. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos, y se sembraron 4500 células por pocillo. 24 horas después de la siembra se trató cada pocillo con la concentración de fármaco oportuna: Temozolomida 100 μM, Trifluoperazina 10μM o una combinación de ambos compuestos

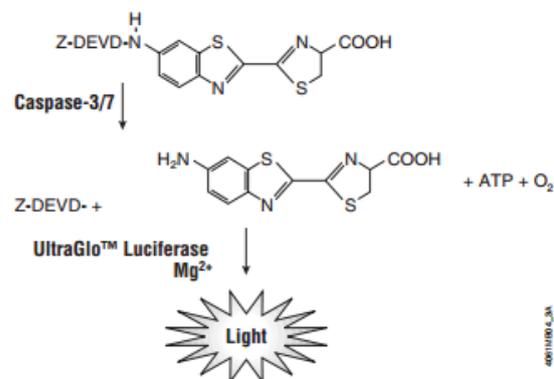


Figura 7. Funcionamiento del kit Caspase-Glo[®] 3/7 Assay. Extraído de ²⁶

(Temozolomida 100 μM y Trifluoperazina 10 μM); cada condición se analiza por duplicado. 48 horas después del tratamiento se mide la actividad caspasa mediante el kit *Caspase-Glo[®] 3/7 Assay* de Promega[®] siguiendo las instrucciones del fabricante²⁶. Este kit contiene un sustrato de la caspasa 3/7 llamado DEVD, que es fragmentado liberándose la aminoluciferina y ésta puede reaccionar con una luciferasa termoestable produciendo luz (*figura 7*). El reactivo produce la lisis de la célula, así las caspasas son liberadas al medio y cuanto mayor sea el contenido en caspasas de las células mayor señal luminosa se producirá. La luminiscencia se

cuantificó utilizando el *Synergy MX Microplate reader* de Biotek®. Además de un ensayo para analizar la actividad caspasa se hizo conjuntamente un test de viabilidad (explicado en el anterior apartado) para así poder corregir la señal obtenida con el número de células presente en cada pocillo.

3.4 Análisis de apoptosis por citometría

Para analizar el nivel de apoptosis con un citómetro de flujo, en primer lugar se sembró, para cada condición estudiada, una placa con 30.000 células. 24 horas después de la siembra se trataron las placas con las diferentes concentraciones: Temozolomida 100 μ M, Trifluoperazina 10 μ M o ambos compuestos (Temozolomida 100 μ M y Trifluoperazina 10 μ M). Tras 48 horas de tratamiento se recoge el medio de cultivo en un tubo falcon de 15mL, después se limpia la placa con 1.5mL de PBS y se deposita el PBS en el mismo tubo falcon (así se obtienen los restos de células que hayan podido morir y por tanto despegarse de la placa). Acto seguido se tripsinizan las células y se neutraliza con medio, introduciéndose el contenido de la placa en el tubo falcon para su posterior centrifugación (5 minutos a 1500 rpm). Una vez centrifugado se aspira el medio y se resuspende el

pellet (que contiene las células y restos celulares) con 1 mL de PBS, que será transferido a un Eppendorf. Una vez realizado este proceso se emplea el kit comercial *Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit* de Thermo Fisher® según las instrucciones del fabricante²⁷ y utilizando posteriormente un citómetro de flujo (COULTER® EPICS®

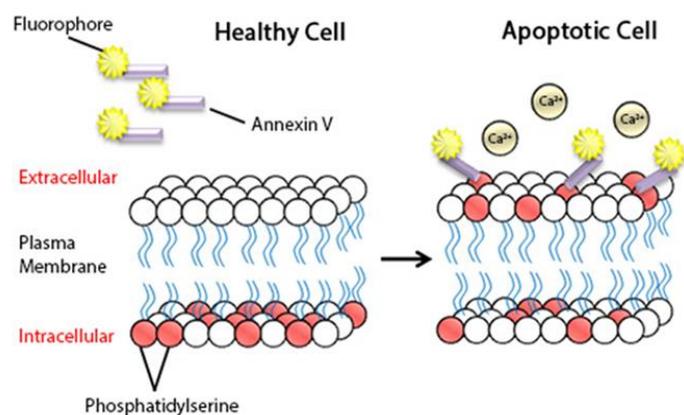


Figura 8. Funcionamiento de la Anexina V marcada. Extraído de ⁴⁰.

XL™ Flow Cytometer) para medir los niveles de apoptosis. El componente principal de este kit es la anexina-V, una proteína que se encuentra marcada con un fluoróforo y tiene una gran afinidad por la fosfatidil serina. La fosfatidil serina durante el proceso de apoptosis temprana se transloca desde la monocapa interna a la monocapa externa de la membrana plasmática siendo así accesible a la anexina V (*figura 8*). El kit también incluye yoduro de propidio, que se une al ADN y no puede atravesar la membrana celular. Si la célula está muerta el yoduro de propidio se podrá unir al ADN y se podrá distinguir entre un estadio temprano de apoptosis

(solo anexina V positivas) de las células muertas (anexina V positivas, yoduro de propidio positivas) y de las vivas (anexina V y yoduro de propidio negativas)²⁷.

3.5 Análisis de proteínas relacionadas con el ciclo celular y apoptosis por Western Blot

Se analizaron los niveles de diversas proteínas relacionadas con la apoptosis y el control del ciclo celular. Para ello se sembraron 400.000 células en una placa por cada condición analizada. Las concentraciones de fármacos utilizadas fueron: Temozolomida 100 μ M, Trifluoperazina 10 μ M y una combinación de ambos (Temozolomida 100 μ M y Trifluoperazina 10 μ M). Las células se recogen 48 y 72 horas después de ser tratadas, se realiza un lavado de la placa con PBS frío y se añaden 250 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, DTT 1mM, NP40 1%, inhibidores de fosfatasas [PMSF, NAF y Na₃VO₄ 1mM], inhibidores de proteasas [Complete Mini tablets, Roche®] y H₂O_{MQ}). Acto seguido se despegan de la placa con un *scraper* y se introducen en un Eppendorf. Después se centrifuga durante 5 minutos, 12000 rpm a 4 °C y se conserva el sobrenadante (que es donde se encuentran las proteínas) a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el kit “DCTM Protein Assay” de BioRad® siguiendo las indicaciones del fabricante²⁸.

El siguiente paso es la separación de proteínas por electroforesis en un gel SDS-PAGE. Para hacer el gel se utilizó Acrilamida (*National Diagnostics*), Tris 1M, SDS 10% (*Sigma-Aldrich*®), APS 13% (*Sigma-Aldrich*®), TEMED (*Sigma-Aldrich*®) y H₂O_{MQ}. El porcentaje de acrilamida utilizado para realizar los geles varía en función del peso molecular de la proteína que se quiere analizar. De las proteínas obtenidas tras el lisado celular y cuantificadas, se cargan en cada pocillo 50 μ g para así separarlas en función del peso molecular gracias a la electroforesis SDS-PAGE.

Una vez separadas las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Millipore®) utilizando el *Trans-Blot* de Bio-Rad®, después se bloquea la membrana con una solución de leche en polvo al 5% en TBS-Tween. Tras el bloqueo de la membrana se incuba con el anticuerpo primario que corresponda (*Tabla 1*) o/n a 4°C en agitación. Se realizan tres lavados con TBS-T y se incuba la membrana con el anticuerpo secundario (Dako®). Tras tres lavados con TBS-T y un último con TBS. Para revelar la membrana se incubó previamente con el “*Immobilion Western Chemiluminiscent HRP Substrate (ECL)*” de Thermo Fisher® y se fijó en

un film (“*High performance chemiluminiscent film*” de Amersham®). Para la fijación en el film se utiliza un revelador y un fijador de Sigma-Aldrich®.

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL
p53	Cortesía de la doctora Xin-Lu
p-Chk1	Cell Signaling
PARP	Cell Signaling
Caspasa 3	Cell Signaling
FOXM1	Santa Cruz
Tubulina	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados.

3.6 Ensayos de clonogenicidad

Se quiso analizar el efecto que tiene la combinación de Temozolomida y Trifluoperazina sobre la capacidad de cada célula de formar nuevas colonias tras un tratamiento. Así que se realizó un ensayo de formación de colonias²⁹, para ello se tratan las células y una vez acabado el tratamiento se tripsinizan y se cuentan. Las células tratadas se siembran a una dilución adecuada para poder analizar el número de colonias que se han formado aproximadamente una semana después (dependiendo de la velocidad de crecimiento). Se siembran 300 células por pocillo en una placa de 6 pocillos y una vez las colonias formadas son lo suficientemente grandes, sin que lleguen a solaparse, se fijan y tiñen con una disolución de glutaraldehído 6% y cristal violeta al 0.5% en H₂O_{MQ}. Tras la tinción las colonias tienen el aspecto de la *figura 9* y se cuentan, después se calcula la eficiencia de plaqueo (PE), que permite obtener la fracción de suervivencia y así poder comparar los distintos experimentos realizados. Ésta se calcula a partir del control:

$$PE = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias formadas}}{n^{\circ} \text{ de células sembradas}}$$

Una vez calculada la eficiencia de plaqueo se calcula la “surviving fraction” (SF) o fracción de supervivencia:

$$SF = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias formadas después del tratamiento}}{n^{\circ} \text{ de células sembradas} \cdot PE}$$

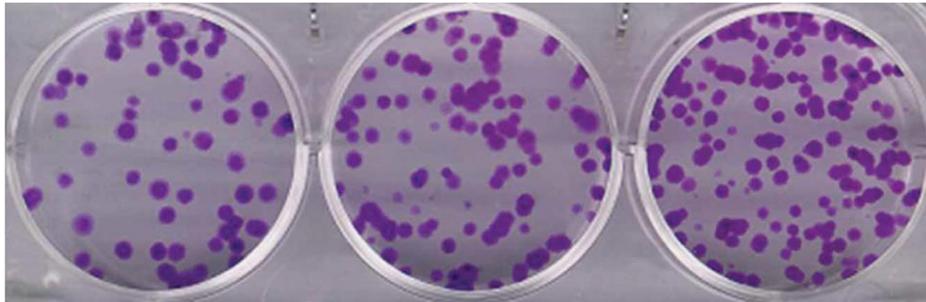


Figura 9. Ensayo de formación de colonias. Resultado observado después de la tinción con cristal violeta 0.5% y glutaraldehído 6%. Extraído de ²⁹.

Se realizaron 3 experimentos diferentes variando el tratamiento:

1. Se realiza un tratamiento de 4 horas con 3 condiciones distintas:
 - TMZ 100 μM
 - TFP 10 μM
 - TMZ 100 μM + TFP 10 μM
2. Se realiza un tratamiento de 1 hora con 5 condiciones distintas:
 - TMZ 10 μM
 - TMZ 25 μM
 - TFP 10 μM
 - TMZ 10 μM + TFP 10 μM
 - TMZ 25 μM + TFP 10 μM
3. Se realiza una preincubación con TFP 10 μM durante 4 horas en todas aquellas condiciones que contengan TFP y posteriormente se trata durante 1 hora con 5 condiciones distintas:
 - TMZ 10 μM
 - TMZ 25 μM
 - TFP 10 μM
 - TMZ 10 μM + TFP 10 μM
 - TMZ 25 μM + TFP 10 μM

3.8 Análisis estadístico

El cálculo de la IC_{50} y la representación de las curvas dosis-respuesta se realizaron con el programa GraphPad. Las diferencias entre los resultados obtenidos fueron evaluadas con el programa *Microsoft Excel 2013* mediante la realización de la prueba t-student. Gracias a esta prueba se puede obtener el p-valor, en función de éste podremos determinar si hay diferencias estadísticamente significativas:

- p-valor < 0.05: Diferencia significativa (*)
- p-valor < 0.01: Diferencia muy significativa (**)
- p-valor < 0.001: Diferencia extremadamente significativa (***)

4. RESULTADOS

4.1 Cálculo de la IC₅₀ de la Temozolomida y de la Trifluoperazina

Se analizó la IC₅₀ (concentración inhibitoria 50) de los dos fármacos utilizados. Ésta se define como la concentración necesaria para para reducir el crecimiento de una población, en este caso celular, al 50% ³⁰. Para ello se realizó una curva dosis-respuesta con cada uno de los fármacos en las dos líneas celulares (*figura 10*). Para representar la curva y poder calcular la IC₅₀ se representa el porcentaje de la viabilidad obtenida (siendo el control 100%) respecto del logaritmo decimal de la concentración del fármaco. Los resultados obtenidos indican que la línea celular U87MG es más sensible a la Temozolomida a concentraciones intermedias (50µM y 100µM), y se puede observar una IC₅₀ menor que con la línea celular LN229 (*figura 10 B*). En cambio para la Trifluoperazina solo se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas a una concentración de 12µM, presentando U87MG una mayor sensibilidad que LN229 (*figura 10 A*).

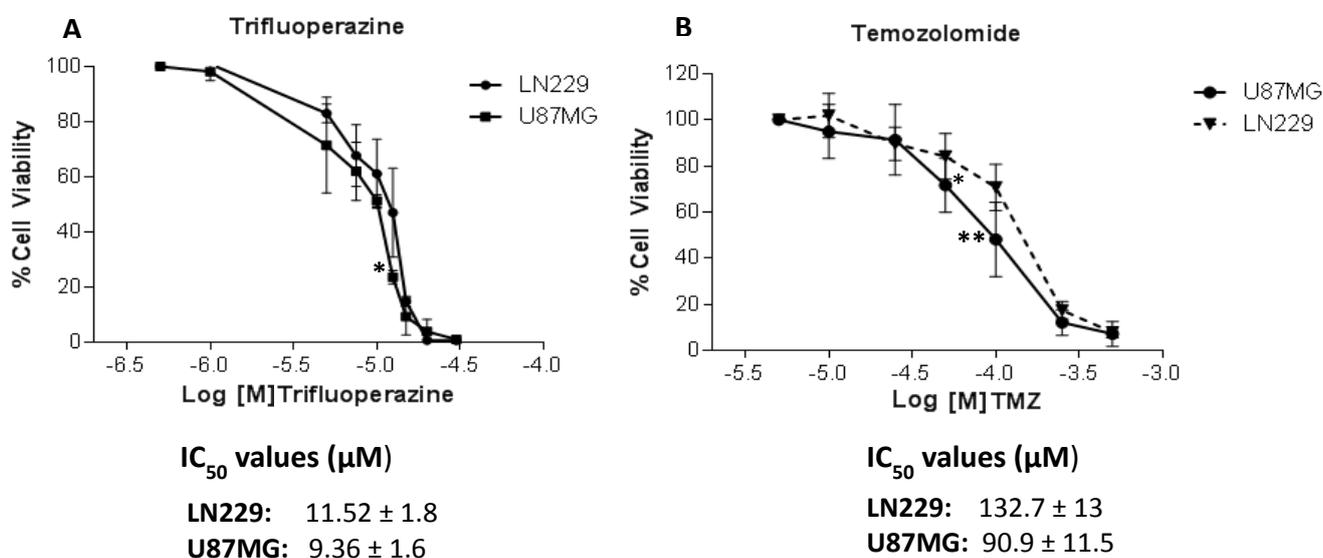


Figura 10. Cálculo de la IC₅₀ de la Trifluoperazina y de la Temozolomida. (A) Curva dosis-respuesta de un tratamiento con TFP de 48 horas para LN229 y U87MG. Se representa la media con el error estándar del porcentaje de viabilidad celular respecto del logaritmo de la concentración de TFP utilizada (1, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 30µM). En la parte inferior se incluye el valor de la IC₅₀ con el error estándar para cada una de las líneas celulares. Este gráfico es el resultado de 4 experimentos independientes. *, $p < 0.05$ (t-test) respecto a LN229. (B) Curva dosis-respuesta de un tratamiento con TMZ a 48 horas para LN229 y U87MG. Se representa la media con el error estándar del porcentaje de viabilidad celular respecto del logaritmo de la concentración de TMZ utilizada (10, 25, 50, 100, 250, 500 µM). En la parte inferior se incluye el valor de la IC₅₀ con el error estándar para cada una de las líneas celulares. Este gráfico es el resultado de 8 experimentos independientes. *, $p < 0.05$ (t-student) respecto a LN229. **, $p < 0.01$ (t-student) respecto a LN229.

4.2 Análisis de cooperación entre los dos fármacos

Una vez obtenidas las IC_{50} de ambos fármacos, se analiza el efecto sobre la viabilidad que tiene la combinación de éstos en las dos líneas celulares utilizadas. Para ello se realiza una dosis respuesta con la Temozolomida (utilizando las mismas concentraciones) y se analiza la variación de la curva, y sobre todo la IC_{50} , al añadir a cada concentración distinta de Temozolomida otra fija de Trifluoperazina. Después con las IC_{50} obtenidas se realiza un isoblograma, en el cual se representa en el eje de ordenadas la IC_{50} de la Temozolomida y en el de abscisas la de Trifluoperazina, uniéndose ambos puntos con una recta (línea de aditividad). Después se representan las IC_{50} obtenidas al añadir la Trifluoperazina, si los puntos quedan por debajo de la recta se puede hablar de un efecto sinérgico, en el cual ambos fármacos ven potenciado su efecto al usarlos conjuntamente, mientras que si se mantienen por encima pero cercanos a la recta el efecto es aditivo.

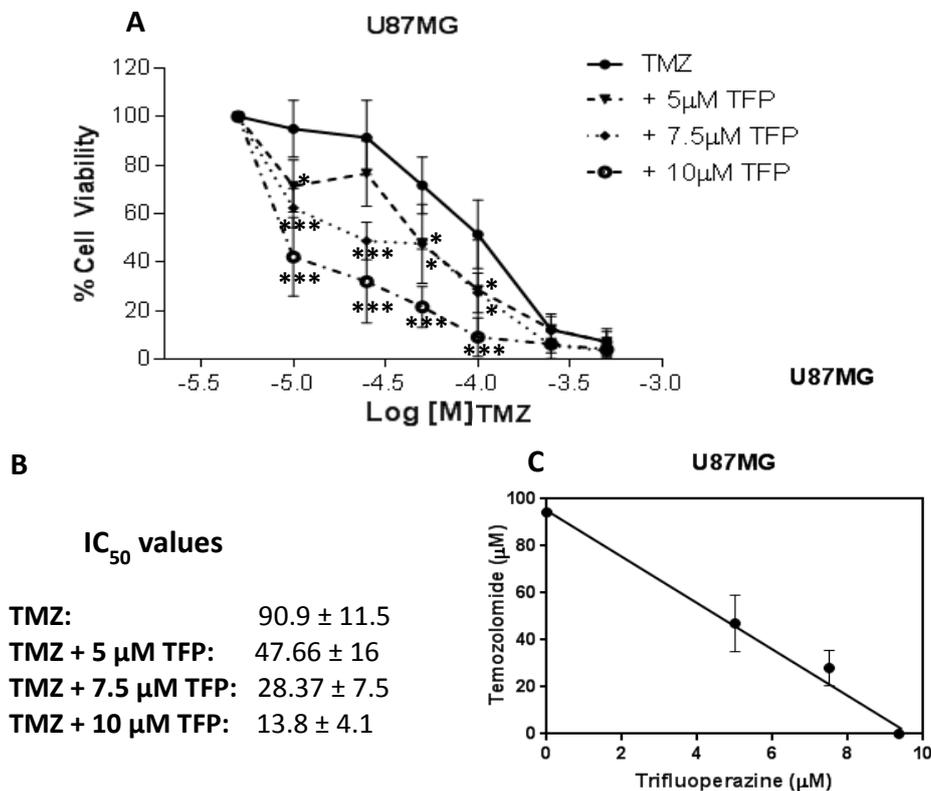


Figura 11. Análisis de cooperación entre Trifluoperazina y Temozolomida en U87MG. (A) Curva dosis-respuesta de la TMZ para U87MG añadiendo a cada concentración otra fija de TFP (0, 5, 7.5 y 10 μ M). Se representa la media \pm el error estándar del porcentaje de viabilidad celular respecto del logaritmo de la concentración. Para la curva de dosis respuesta de TMZ con TFP 10 μ M y con TFP 7.5 μ M se realizaron 4 experimentos independientes y para la curva dosis-respuesta de TMZ con TFP 5 μ M 3 experimentos independientes. (B) Valor de IC_{50} (media \pm error estándar) del tratamiento con TMZ 48 horas en U87MG y la variación de ésta añadiendo una concentración fija de TFP (0, 5, 7.5 y 10 μ M). (C) Isoblograma con las distintas IC_{50} de la TMZ y la TFP a 48 horas. *, $p < 0.05$ (t-student) respecto al control. **, $p < 0.01$ (t-student) respecto al control. ***, $p < 0.001$ (t-student) respecto al control.

Para la línea celular U87MG (figura 11), observando la curva de dosis respuesta (figura 11 A), las tres concentraciones de Trifluoperazina (5, 7.5 y 10 μM) añadidas a las de Temozolomida disminuyen de manera clara la viabilidad celular obtenida solamente mediante el uso de Temozolomida. Solo a concentraciones muy elevadas de Temozolomida (250 y 500 μM) se igualan los efectos producidos por ésta y los obtenidos con la combinación de ambos fármacos. La IC_{50} de cualquiera de las tres combinaciones utilizadas es notablemente menor que la IC_{50} de la Temozolomida, y cuanto más elevada es la concentración de Trifluoperazina utilizada menor es la IC_{50} obtenida de la combinación (figura 11 B). Observando el isoblograma (figura 11 C) se puede apreciar que el efecto observado a las concentraciones estudiadas de ambos fármacos utilizadas es de aditividad.

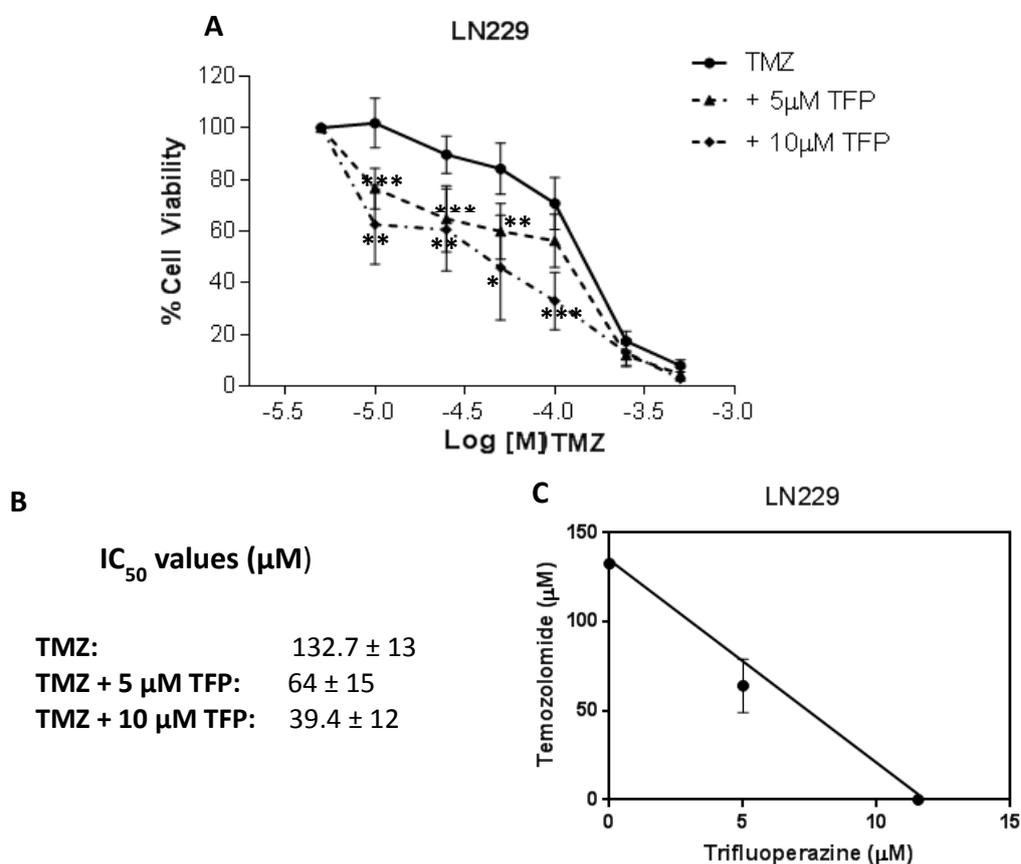


Figura 12. Análisis de cooperación entre la Trifluoperazina y la Temozolomida en LN229. (A) Curva dosis-respuesta de la TMZ para LN229 añadiendo a cada concentración, otra fija de TFP (0, 5 y 10 μM). Se representa la media \pm el error estándar del porcentaje de viabilidad celular respecto del logaritmo de la concentración. Para la curva de dosis respuesta de TMZ con TFP 10 μM y con TFP 5 μM se realizaron 5 experimentos independientes. (B) Valor de IC_{50} (media \pm error estándar) del tratamiento con TMZ 48 horas en LN229 y la variación de ésta añadiendo una concentración fija de TFP (0, 5 y 10 μM) (C) Isoblograma con las distintas IC_{50} de la TMZ y la TFP a 48 horas. *, $p < 0.05$ (t-student) respecto al control. **, $p < 0.01$ (t-student) respecto al control. ***, $p < 0.001$ (t-student) respecto al control.

Con la línea celular LN229 (*figura 12*) los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con U87MG (*figura 11*). En esta línea solo se han utilizado dos concentraciones de Trifluoperazina distintas (5 y 10 μM) con las de Temozolomida y en ambas combinaciones los resultados de viabilidad han sido notablemente menores que los obtenidos solamente con Temozolomida, y solo a concentraciones de esta última muy elevadas (250 y 500 μM) los efectos del fármaco se igualan con los obtenidos con la combinación de ambos (*figura 12 A*). Las IC_{50} también se reducen drásticamente al utilizar junto con la Temozolomida una concentración fija de Trifluoperazina, y cuanto mayor es la concentración de Trifluoperazina mayor es la disminución de la IC_{50} (*figura 12 B*). En el isoblograma se ha analizado la IC_{50} obtenida con 5 μM de Trifluoperazina y el efecto producido por la combinación sería moderadamente sinérgico (*figura 12 C*).

4.3 Efectos sobre la actividad apoptótica de Trifluoperazina y Temozolomida

Al haber comprobado el efecto de ambos fármacos por separado y la combinación sobre la viabilidad celular, se propuso si ese descenso en la viabilidad se correspondía con un aumento de la apoptosis.

Para ello se analizó la actividad caspasa inducida por la Temozolomida y la Trifluoperazina por separado y combinadas (*figura 13*). Se trataron las células con Temozolomida 100 μM , Trifluoperazina 10 μM o su combinación (TMZ 100 μM y TFP 10 μ), ambas concentraciones son cercanas a la IC_{50} analizada anteriormente en U87MG y LN229.

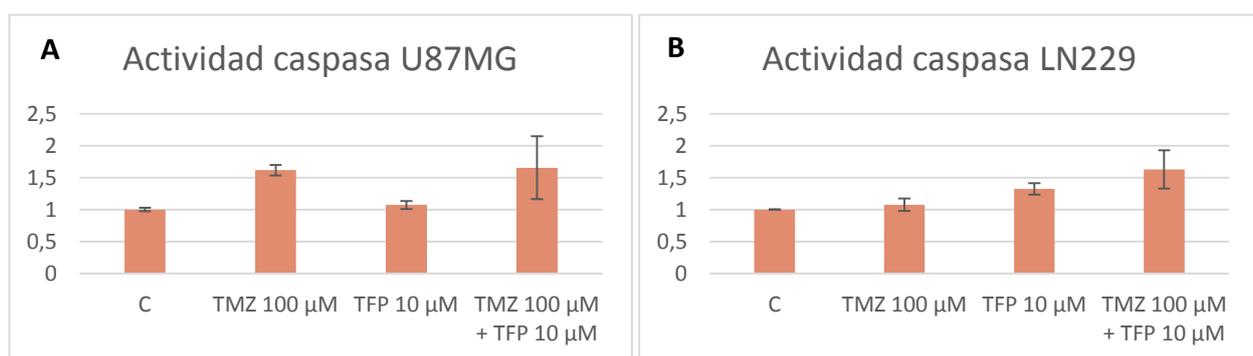


Figura 13. Análisis de la actividad caspasa. (A) Actividad caspasa en células U87MG tras un tratamiento de 48 horas con TMZ (100 μM), TFP (10 μM) o TMZ (100 μM) y TFP (10 μM). (B) Actividad caspasa en células LN229 tras un tratamiento de 48 horas con TMZ (100 μM), TFP (10 μM) o TMZ (100 μM) y TFP (10 μM).

Tanto en la línea celular U87MG (*figura 13 A*) como LN229 (*figura 13 B*) no se aprecia ningún aumento significativo de la actividad caspasa respecto al control con cualquiera de los tres tratamientos utilizados durante 48 horas

A parte de la técnica anterior para medir la actividad caspasa y por ende el nivel de apoptosis, éste también se observó en células U87MG mediante el uso de un citómetro de flujo. Para ello se utilizó el kit comercial “Alexa Fluor® 488, Propidium iodide” comentado anteriormente en el apartado materiales y métodos. Gracias a este kit se puede analizar por citometría el nivel de apoptosis de las células en función de si son Anexina V positivas (células en apoptosis) o Anexina V negativas (células viables).

Los resultados obtenidos por citometría en células U87MG (*figura 14*) muestran que no se produce ningún aumento significativo en el nivel de apoptosis con ninguno de los tratamientos a las 48 horas.

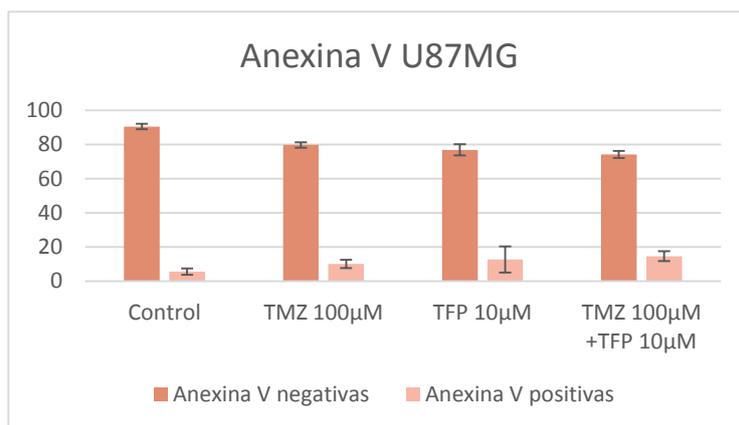


Figura 14. Ensayo con anexina V. Porcentajes de células anexina V negativas (vivas) y anexina V positivas (apoptosis) después de un tratamiento de 48 horas con TMZ (100 µM), TFP (10 µM) o TMZ (100 µM) y TFP (10 µM) en células U87MG. Este gráfico se ha obtenido mediante 2 experimentos independientes.

Además de los anteriores métodos utilizados también se ha comprobado si había un aumento en la apoptosis mediante Western blot, para ello se han analizado mediante esta técnica proteínas implicadas en la apoptosis, como son la caspasa 3 y PARP.

En U87MG solo se analizó la caspasa 3 (*figura 15*) y no se aprecia ninguna banda inferior que indique una ruptura de la caspasa 3 y por tanto una activación del proceso de la apoptosis después de un tratamiento de 48 y 72 horas con Temozolomida, Trifluoperazina ni con la combinación de ambos.

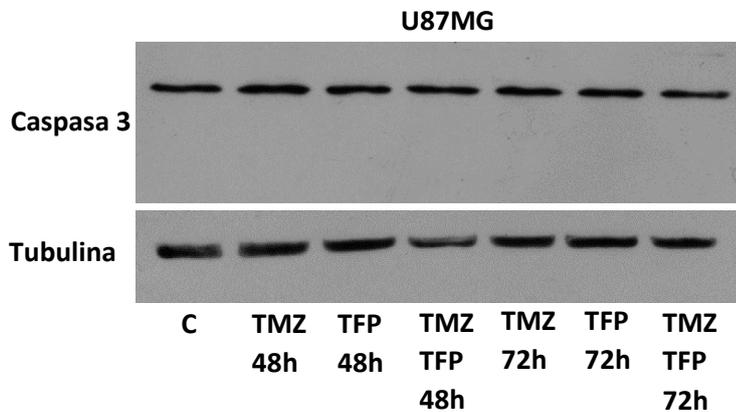


Figura 15. Análisis por western blot en células de U87MG de proteínas relacionadas con la apoptosis. Se analiza en células U87MG la caspasa 3, implicada en el proceso de apoptosis. Como control de carga se utiliza la tubulina. Las células fueron tratadas con TMZ (100 μ M), TFP (10 μ M) o TMZ (100 μ m) y TFP (10 μ m) a 48 y a 72 horas.

En LN229 además de la caspasa 3 se analiza PARP (*figura 16*), y al igual que sucedía en U87MG (*figura 15*) con la caspasa 3, no se observa ninguna banda inferior que muestre una ruptura de esta proteína ni tampoco con PARP. De modo que los resultados obtenidos tras el análisis por western blot de estas proteínas, es que no se ha iniciado ningún proceso de apoptosis ni con los fármacos por separado, ni combinados durante un tratamiento de 48 y 72 horas.

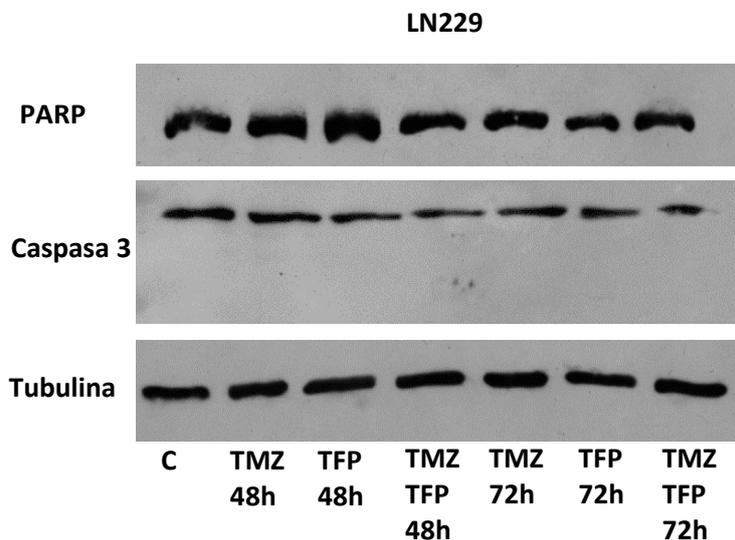


Figura 16. Análisis por western blot en células de LN229 de proteínas relacionadas con la apoptosis. Se analizan en células LN229 proteínas relacionadas con la apoptosis: PARP y caspasa 3. Como control de carga se utiliza la tubulina. Las células fueron tratadas con TMZ (100 μ M), TFP (10 μ M) o TMZ (100 μ m) y TFP (10 μ m) a 48 y a 72 horas.

El resultado global de estos resultados es que con ninguno de los tratamientos analizados en ambas líneas celulares se observa un aumento significativo respecto al control de la apoptosis a 48 y 72 horas.

4.4 Análisis por Western Blot de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular y respuesta al daño en el ADN

Una vez analizado el efecto de la Temozolomida, Trifluoperazina y su combinación sobre la viabilidad celular y la apoptosis, se pretendió observar el efecto de estos fármacos sobre diversas proteínas relacionadas con el ciclo celular.

En el caso de las U87MG solo se analizó por esta técnica p53 (figura 17). De los resultados obtenidos se puede apreciar un aumento de esta proteína en los dos tratamientos con Temozolomida (48 y 72 horas), mientras que con la Trifluoperazina no hay diferencias con el control ni a 48, ni a 72 horas. Así que tanto a 48 como a 72 horas el aumento de la cantidad de proteína respecto el control, observado en el tratamiento con ambos fármacos, podría atribuirse al efecto de la Temozolomida, puesto que en ninguno de los dos casos consigue superarse el efecto de la Temozolomida en solitario y la Trifluoperazina no parece variar la cantidad de p53.

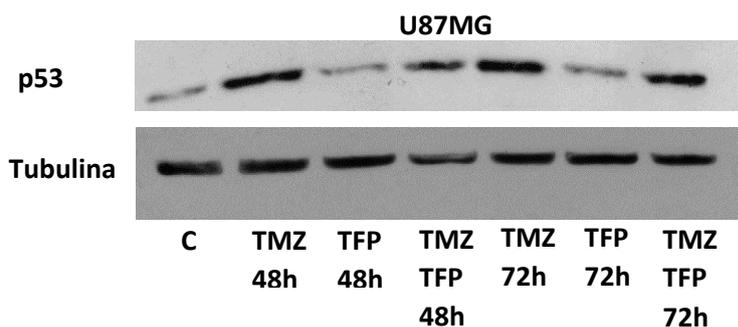


Figura 17. Análisis por western blot en células de U87MG de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular. Se analiza en células U87MG p53, que es una proteína implicada en la respuesta al daño en el ADN y control del ciclo celular. Como control de carga se utiliza la tubulina. Las células fueron tratadas con TMZ (100µM), TFP (10µM) o TMZ (100µM) y TFP (10µM) a 48 y a 72 horas.

En la línea celular LN229 se analizaron diversas proteínas relacionadas con el ciclo celular y en la respuesta al daño en el ADN como p53, p-Chk1, FOXM1 (figura 18).

En LN229 p53 tiene un patrón de bandas muy similar al observado en U87MG (figura X), en ambos tratamientos con Temozolomida (48 y 72 horas) se puede apreciar un aumento de p53 respecto al control, mientras que con la Trifluoperazina no se aprecian diferencias. El aumento observado en el tratamiento con ambos fármacos no es mayor que el observado con la Temozolomida por si sola.

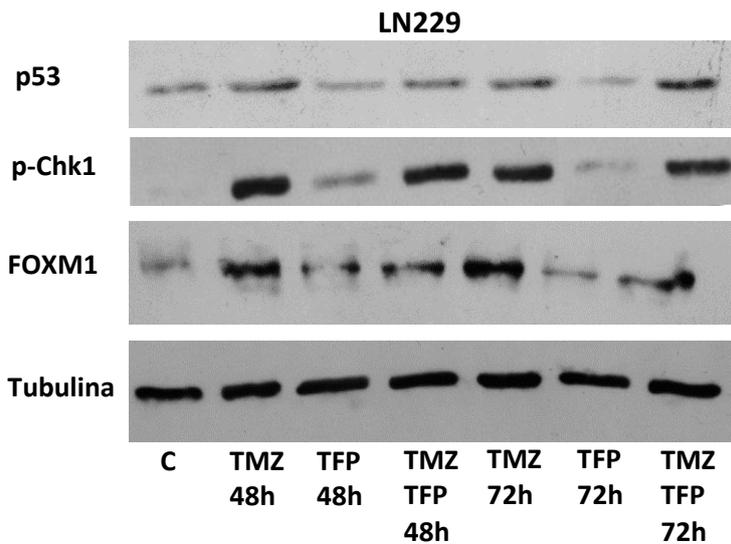


Figura 18. Análisis por western blot en células de LN229 de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular y la respuesta al daño en el ADN. Se analizan en células LN229 proteínas que tienen repercusión sobre el ciclo celular y el daño en el ADN: p53, p-Chk1, FOXM1. Como control de carga se utiliza la tubulina. Las células fueron tratadas con TMZ (100µM), TFP (10µM) o TMZ (100µM) y TFP (10µM) a 48 y a 72 horas.

En cuanto a p-Chk1 los tratamientos con Temozolomida a 48 y 72 horas producen un aumento de p-Chk1. Tanto con Trifluoperazina como con Temozolomida se puede apreciar un ligero aumento de p-Chk1 tanto a 48 horas como a 72. Aunque con ambos fármacos se observa un incremento en la cantidad de proteína, el aumento producido por la Temozolomida es tan intenso que no se aprecian diferencias entre la Temozolomida sola o combinada con Trifluoperazina.

FOXM1 es una proteína que también se ve incrementada después de un tratamiento con Temozolomida, tanto a 48 como a 72 horas y con Trifluoperazina los niveles no parecen variar respecto al control. El tratamiento con los dos fármacos también aumenta la cantidad de FOXM1, aunque este incremento es notablemente menor que el producido solo con la Temozolomida, por lo que la Trifluoperazina reduce el aumento de FOXM1 ocasionado por la Temozolomida.

4.5 Ensayo de clonogenicidad

Otro parámetro analizado en este trabajo es la clonogenicidad, es decir, la capacidad que tienen las células de formar nuevas colonias una vez han sido tratadas con Temozolomida, Trifluoperazina o la combinación de ambas.

Para ello se trataron las células con las concentraciones de ambos fármacos utilizadas anteriormente (Temozolomida 100 µM y Trifluoperazina 10 µM) durante 4 horas, después se sembraron 300 células y se contaron las colonias obtenidas, para posteriormente calcular la “surviving fraction” (fracción de supervivencia).

Los resultados obtenidos (*figura 19*) indican una efectividad muy elevada de la Temozolomida en ambas líneas celulares, puesto que no se pudo formar ninguna colonia, mientras que con el tratamiento con Trifluoperazina no se aprecian diferencias significativas respecto el control. Con la combinación de ambos tampoco se pudo contar ninguna colonia.

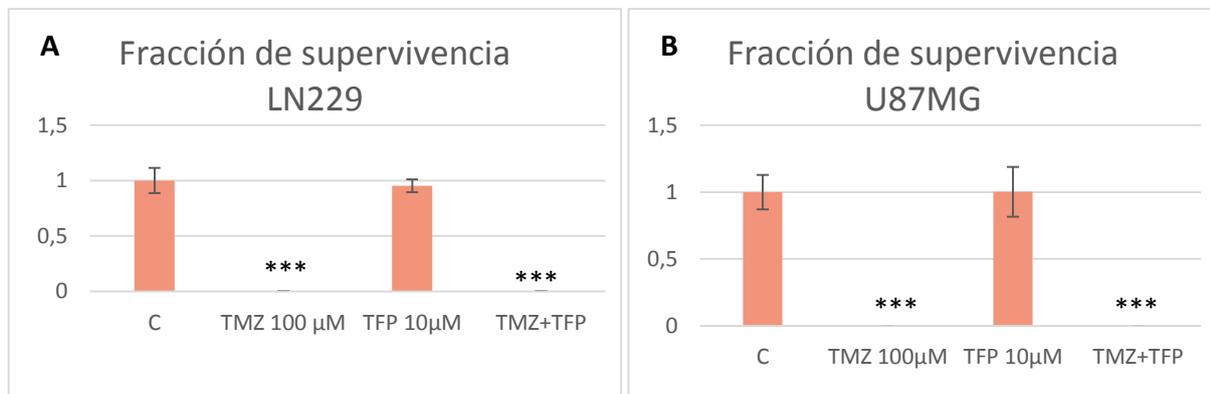


Figura 19. Ensayo de clonogenicidad (1). (A) Fracción de supervivencia obtenida tras un tratamiento de 4 horas con: TMZ (100μM), TFP (10μM) o TMZ (100μM) y TFP (10μM) en células LN229. (B) Fracción de supervivencia obtenida tras un tratamiento de 4 horas con: TMZ (100μM), TFP (10μM) o TMZ (100μM) y TFP (10μM) en células U87MG. *, $p < 0.05$ (t-student) respecto al control. ***, $p < 0.001$ (t-student) respecto al control.

Debido a la gran efectividad de la Temozolomida sobre la clonogenicidad, no se pudo evaluar si el hecho de añadir Trifluoperazina a la Temozolomida mejoraba los efectos de ésta. Así pues, con la finalidad de estudiar con más detalle el efecto de la combinación de ambos fármacos, se redujo el tiempo de tratamiento de 4 horas a 1 hora, y la concentración utilizada de Temozolomida pasó de 100 μM a 10 μM y 25 μM (*figura 20*).

Con las concentraciones utilizadas si se consiguió contar colonias tras el tratamiento con Temozolomida, pudiéndose observar una disminución significativa de la fracción de supervivencia tanto a 10 μM como a 25 μM en ambas líneas celulares. Con la Trifluoperazina no se observan diferencias respecto al control en U87MG y LN229. Los efectos de los tratamientos con la combinación de ambos fármacos son iguales a los producidos solamente con la Temozolomida.

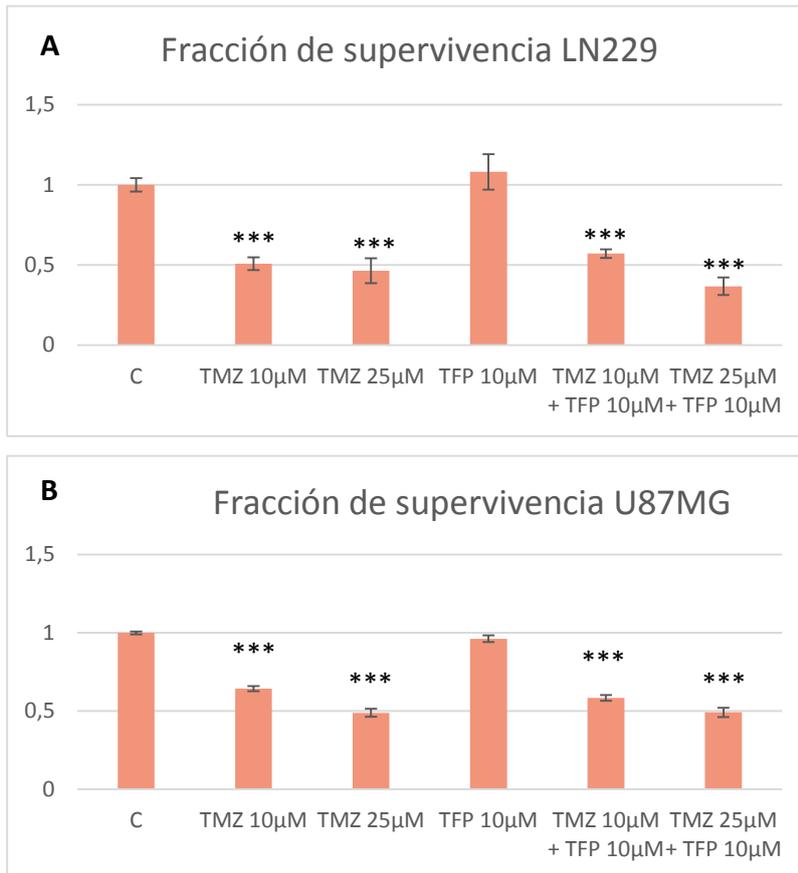


Figura 20. Ensayo de clonogenicidad (2). (A) Fracción de supervivencia obtenida tras un tratamiento de 1 hora con: TMZ (10µM), TMZ (25µM), TFP (10µM), TMZ (10µM) y TFP (10µM) o TMZ (25µM) y TFP (10µM) en células LN229. ***, $p < 0.001$ (t-test) respecto al control.

(B) Fracción de supervivencia obtenida tras un tratamiento de 1 hora con: TMZ (10µM), TMZ (25µM), TFP (10µM), TMZ (10µM) y TFP (10µM) o TMZ (25µM) y TFP (10µM) en células U87MG. ***, $p < 0.001$ (t-test) respecto al control.

Ambos gráficos (A y B) se han realizado con 2 experimentos independientes.

Debido al corto tiempo de los tratamientos (1 hora), en aquellos que contuvieran Trifluoperazina se realizó antes un pretratamiento de 4 horas con Trifluoperazina a una concentración de 10 µM. Después de este pretratamiento se realizaron los tratamientos de 1 hora con los fármacos que correspondieran a la condición analizada.

Los resultados (figura 21), pese al pretratamiento realizado, fueron idénticos a los anteriores. El Tratamiento con Temozolomida a 10 y 25 µM reduce significativamente el número de colonias obtenidas, como así se ve reflejado en la fracción de supervivencia. En cambio la Trifluoperazina no reduce el número de colonias, puesto que la fracción de supervivencia no varía respecto al control. El tratamiento con los dos fármacos tiene un efecto sobre la clonogenicidad muy similar al producido solamente con la Temozolomida.

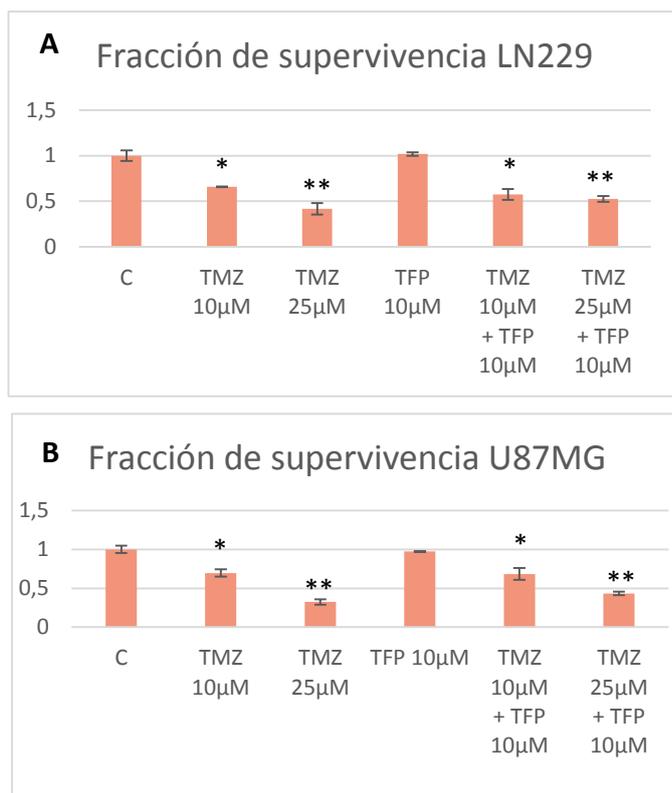


Figura 21. Ensayo de clonogenicidad (3).

(A) Fracción de supervivencia obtenida tras un tratamiento de 1 hora con: TMZ (10µM), TMZ (25µM), TFP (10µM), TMZ (10µM) y TFP (10µM) o TMZ (25µM) y TFP (10µM) en células LN229 que previamente han sido incubadas durante 4 horas con TFP 10µM (solo las condiciones que llevan TFP). *, $p < 0.05$ (t-student) respecto al control. **, $p < 0.01$ (t-student) respecto al control.

(B) Fracción de supervivencia obtenida tras un tratamiento de 1 hora con: TMZ (10µM), TMZ (25µM), TFP (10µM), TMZ (10µM) y TFP (10µM) o TMZ (25µM) y TFP (10µM) en células U87MG que previamente han sido incubadas durante 4 horas con TFP 10µM (solo las condiciones que llevan TFP). *, $p < 0.05$ (t-student) respecto al control. **, $p < 0.05$ (t-student) respecto al control.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la viabilidad indican un buen potencial terapéutico acerca del uso combinado de Temozolomida y Trifluoperazina. Los ensayos realizados indican una reducción importante de ésta al usar la combinación de ambos fármacos. La Trifluoperazina podría utilizarse para aumentar el efecto del tratamiento con Temozolomida, o bien para reducir la dosis de esta última.

La Temozolomida induce daño en el ADN, hecho que ocasiona un arresto del ciclo celular en fase G2/M y posteriormente la apoptosis³¹. Los resultados obtenidos no muestran que se haya producido apoptosis, esto es debido a que los tratamientos se han realizado durante 48 horas y diversos estudios indican que la apoptosis se produce entre las 96 y 120 horas después del tratamiento^{32,33}. La reducción de la viabilidad y que no se active la apoptosis concuerda con la idea del arresto en fase G2/M y apoptosis tardía.

Los resultados obtenidos al analizar por *Western blot* proteínas relacionadas con el daño en el ADN y el ciclo celular concuerdan con los tratamientos utilizados. Al provocar la Temozolomida daño en el ADN se induce la expresión de proteínas como p53 y p-Chk1, que

forman parte de complejos proteicos implicados en la respuesta al daño en el ADN para su reparación y el control del ciclo celular. Estos aumentos se pudieron apreciar en ambas líneas celulares, aunque hay que destacar que las células LN229 poseen una mutación en el gen de p53 que aunque se exprese la proteína, ésta no es funcional³⁴, de modo que para el arresto del ciclo celular no es imprescindible p53, hecho constatado específicamente en otro estudio.³¹

Uno de los efectos que se producen con la Temozolomida es un aumento en la expresión de FOXM1, que se origina como respuesta al daño en el ADN producido por el fármaco. Este hecho es negativo para el tratamiento y una elevada expresión de FOXM1 se correlaciona con una cierta resistencia al tratamiento con Temozolomida³⁵. Los resultados obtenidos mediante Western blot sobre la cantidad de FOXM1 después del tratamiento con Temozolomida sostienen esta idea, puesto que se aprecia un aumento significativo de FOXM1 respecto al control. En cambio cuando la Temozolomida se combina con Trifluoperazina, parece que se reduce la cantidad de FOXM1 respecto al tratamiento con Temozolomida, de modo que la Trifluoperazina podría actuar potenciando la Temozolomida. Esto podría explicar el efecto moderadamente sinérgico observado a las dosis estudiadas en una línea celular más resistente a la Temozolomida como la LN229, mientras que U87MG es más sensible y a las dosis estudiadas no se observó un efecto sinérgico, aunque eso no implica que a otras dosis si pueda haber una sinergia entre los dos fármacos en U87MG.

Algunos estudios sugieren que la Trifluoperazina podría actuar inhibiendo la reparación en el ADN, hecho que implicaría una potenciación de la actividad que tienen los tratamientos que ocasionan daño en el ADN^{36,37}. Este efecto implica que la Trifluoperazina en combinación con la Temozolomida debería aumentar la acción de esta última sobre la clonogenicidad. Los resultados, en cambio, no mostraron este efecto, puesto que no se observó ninguna potenciación en este parámetro. Estos estudios con resultados positivos en cuanto a la capacidad de potenciar el efecto anticlonogénico por parte de la Trifluoperazina se obtuvieron combinándola con radioterapia³⁶ y Bleomicina, un fármaco que induce una rotura en el ADN³⁷. Tanto la Bleomicina como la radioterapia producen una doble rotura en el ADN, en cambio la Temozolomida primero ocasiona una metilación del ADN^{13,36,37}. Así que, estos resultados podrían explicarse gracias a la diferencia en las vías de reparación que actúan frente al daño producido por la Temozolomida y el producido por la radioterapia y la Bleomicina, de modo

que la Trifluoperazina podría actuar inhibiendo el mecanismo de reparación inducido por la radioterapia y Bleomicina, pero no con el mecanismo de reparación inducido por la Temozolomida. No obstante, como se ha podido apreciar en los resultados obtenidos, la Temozolomida tiene un efecto importante sobre la clonogenicidad y a diferencia de la Bleomicina, cuyos efectos en la clonogenicidad si se ven potenciados con la Trifluoperazina, puede atravesar la barrera hematoencefálica y utilizarse en el tratamiento de gliomas³⁸.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son:

1. El tratamiento con Temozolomida y Trifluoperazina tiene un efecto mucho mayor que el producido solamente con la Temozolomida, reduciendo la viabilidad celular en LN229 y U87MG.
2. La Trifluoperazina no acelera la apoptosis a largo plazo producida por la Temozolomida.
3. La Trifluoperazina no potencia la actividad anticlonogénica de la Temozolomida.

La conclusión global sería que la combinación de Temozolomida con Trifluoperazina tiene un buen potencial terapéutico en el tratamiento de Glioblastomas.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Glioma - MeSH - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005910>. Accessed August 28, 2015.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
3. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683-2710. doi:10.1101/gad.1596707.
4. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(8):1061-1083. doi:10.1517/13543780903052764.
5. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, et al. [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev Neurol (Paris).* 2008;164(6-7):505-515. doi:10.1016/j.neurol.2008.03.011.
6. aecc. <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/SISTEMANERVIOSOCENTRAL/Paginas/Incidencia.aspx>. Accessed August 29, 2015.
7. Schwartzbaum J a, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2(9):494-503; quiz 1 p following 516. doi:10.1038/ncpneuro0289.

8. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO Transcription Factors : Their Clinical Significance and Regulation. 2014;2014(Figure 1).
9. Nho RS, Hergert P. FoxO3a and disease progression. *World J Biol Chem.* 2014;5(3):346-354. doi:10.4331/wjbc.v5.i3.346.
10. Gomes AR, Zhao F, Lam EWF. Role and regulation of the forkhead transcription factors FOXO3a and FOXM1 in carcinogenesis and drug resistance. *Chin J Cancer.* 2013;32(7):365-370. doi:10.5732/cjc.012.10277.
11. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol.* 2003;21(8):1624-1636. doi:10.1200/JCO.2003.05.063.
12. Baghya Nirmani Wijenayake G. Investigation of Psychotropic Drugs for the Treatment of Glioblastoma. 2014.
13. Dresemann G. Temozolomide in malignant glioma. *Onco Targets Ther.* 2010;3:139-146. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2939767&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 29, 2015.
14. Villano JL, Seery TE, Bressler LR. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;64(4):647-655. doi:10.1007/s00280-009-1050-5.
15. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007;6(8):1079-1099. doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.008.
16. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003. doi:10.1056/NEJMoa043331.
17. Erice O, Smith MP, White R, et al. MGMT expression predicts PARP-mediated resistance to temozolomide. *Mol Cancer Ther.* 2015. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0810.
18. Koch K, Mansi K, Haynes E, Adams CE, Sampson S, Furtado VA. Trifluoperazine versus placebo for schizophrenia. *Cochrane database Syst Rev.* 2014;1:CD010226. doi:10.1002/14651858.CD010226.pub2.
19. Zong D. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PHENOTHIAZINES IN EXPERIMENTAL CANCER THERAPY. 2012.
20. Vallejo MS. *Tratado de Psicofarmacología.* Ed. Médica Panamericana <https://books.google.com/books?id=ugBvQChj4JAC&pgis=1>. Accessed August 31, 2015.
21. Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, et al. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell.* 2003;4(6):463-476. doi:10.1016/S1535-6108(03)00303-9.
22. U-87 MG ATCC® HTB-14™ Homo sapiens brain glioblastoma; astr. <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx#characteristics>. Accessed August 26, 2015.
23. Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Maity A. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res.* 2003;63(1):236-241. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517803>. Accessed August 26, 2015.
24. LN-229 ATCC® CRL-2611™ Homo sapiens brain/right frontal pa. <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2611.aspx#characteristics>. Accessed August 26, 2015.
25. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Protocol. <https://www.promega.es/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/>. Accessed August 25, 2015.

26. Caspase-Glo® 3/7 Assay Protocol. <https://www.promega.es/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-37-assay-protocol/>. Accessed August 25, 2015.
27. Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit. <http://www.thermofisher.com/es/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/flow-cytometry-protocol/apoptosis/alexa-fluor-488-annexin-v-dead-cell-apoptosis-kit.html#prot2>. Accessed August 25, 2015.
28. DC™ Protein Assay | | Bio-Rad. <http://www.bio-rad.com/es-es/product/dc-protein-assay>. Accessed August 26, 2015.
29. Franken N a P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-2319. doi:10.1038/nprot.2006.339.
30. Inhibitory Concentration 50 - MeSH - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=IC50>. Accessed August 23, 2015.
31. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2001;61(5):1957-1963. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11280752>. Accessed September 2, 2015.
32. Roos WP, Batista LFZ, Naumann SC, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*. 2007;26(2):186-197. doi:10.1038/sj.onc.1209785.
33. Naumann SC, Roos WP, Jöst E, et al. Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer*. 2009;100(2):322-333. doi:10.1038/sj.bjc.6604856.
34. Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, et al. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 1994;54(3):649-652. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306326>. Accessed September 2, 2015.
35. Zhang N, Wu X, Yang L, et al. FoxM1 inhibition sensitizes resistant glioblastoma cells to temozolomide by downregulating the expression of DNA-repair gene Rad51. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5961-5971. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0039.
36. Gangopadhyay S, Karmakar P, Dasgupta U, Chakraborty A. Trifluoperazine stimulates ionizing radiation induced cell killing through inhibition of DNA repair. *Mutat Res*. 2007;633(2):117-125. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.05.011.
37. Polischouk AG, Holgersson A, Zong D, 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*. 2007;6(8):2303-2309. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0402.
38. Morantz RA, Kimler BF, Vats TS, Henderson SD. Bleomycin and brain tumors. A review. *J Neurooncol*. 1983;1(3):249-255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206209>. Accessed September 3, 2015.
39. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. <https://www.promega.es/products/pm/celltiter-glo/>. Accessed August 25, 2015.
40. Taper » Apoptosis temprana: Anexina V. <http://www.taper.es/apoptosis-temprana-anexina-v/>. Accessed August 25, 2015.
41. Pathway of the Day: PI3K/AKT/mTOR | ESMO. <http://www.esmo.org/Conferences/Past-Conferences/ESMO-2014-Congress/News-Articles/Pathway-of-the-Day-PI3K-AKT-mTOR>. Accessed September 1, 2015.