



Anàlisi “ex vivo” de mecanismes d’inducció d’apoptosi i resistència al tractament en gliomes malignes

Ruth Villalonga Planells

ADVERTIMENT. La consulta d’aquesta tesi queda condicionada a l’acceptació de les següents condicions d’ús: La difusió d’aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d’investigació i docència. No s’autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d’un lloc aliè al servei TDX. No s’autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you’re accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it’s obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
Programa de Doctorat "Biomedicina"

Ruth Villalonga Planells

**Anàlisi "ex vivo" de mecanismes d'inducció d'apoptosi i
resistència al tractament en gliomes malignes**

DIRECTORS DE LA TESI

Dra. Avelina TORTOSA I MORENO
Dra. Josefa GIMÉNEZ BONAFÉ

Data de lectura: 14 de setembre de 2011

Resultats

Objectiu 1: Establiment de cultius primaris de gliomes a partir de mostres tumorals humanes

1.1 Introducció als cultius primaris

Les línies cel·lulars comercials han permès efectuar grans avenços en l'estudi del creixement i diferenciació cel·lular, en l'anàlisi dels mecanismes d'acció implicats en la resposta cel·lular davant d'un estímul determinat, així com en el desenvolupament de manipulacions gèniques per a comprendre millor l'estructura i funció dels gens. Aquesta habilitat per estudiar les cèl·lules depèn sobretot de la facilitat amb que les línies cel·lulars poden créixer i ser manipulades al laboratori. No obstant, després d'un determinat nombre de passes, el patró d'expressió gènica pot variar de forma considerable en relació amb les alteracions moleculars inicials. Una forma d'evitar-ho es mitjançant l'ús de cultius primaris obtinguts a partir d'un teixit tumoral en fresc. Aquests cultius reproduïen amb més fidelitat les alteracions moleculars del tumor primari, i dins d'uns límits, s'espera que el seu comportament s'assembla més al tumor del qual procedeixen. Cal tenir en compte, que a mesura que es van realitzant passes en el laboratori, les cèl·lules tumorals tenen més possibilitats d'adquirir noves mutacions gèniques i allunyar-se del tumor inicial d'on procedien. Això implica que, per treballar amb cultius primaris, es necessari utilitzar passes baixes (inferior a 6 passes per tal de tenir resultats reproduïbles (Lee J, 2006)). A més, un altre inconvenient dels cultius primaris, a diferència de les línies cel·lulars, és que al no estar immortalitzats es freqüent observar que després d'un nombre limitat de divisions les cèl·lules esdevenen senescents i moren.

El primer objectiu d'aquesta tesi va ser establir cultius primaris de gliomes malignes humans amb mostres de teixit fresc procedents del Servei de Neurocirurgia de HUB. La present tesi ha permès establir el protocol de cultius primaris de glioma amb medi amb sèrum així com també amb medi amb factors de creixement específics i sense sèrum, que permet el creixement de les cèl·lules mare tumorals o *cèl·lules iniciadores de tumors* (TIC).

1.2 Característiques histològiques dels cultius primaris establerts

Durant el període de realització de la tesi doctoral, es varen processar 80 mostres, de les quals 56 es varen cultivar amb medi amb sèrum, 14 amb medi sense sèrum i 10 amb ambdós medis de cultiu. El diagnòstic histològic de les mostres cultivades va ser: GBM (51), astrocitoma anaplàstic (12), astrocitoma difús grau II (4), oligodendroglioma anaplàstic (2), oligodendroglioma grau II (4), metàstasi cerebral (3), craniofaringioma (1), mostra no tumoral (3) (Figura 1). Cal destacar que totes les mostres processades amb medi sense sèrum o ambdós medis tenien el diagnòstic histològic de GBM ($n = 14$ i $n = 10$, respectivament). A diferència dels cultius amb sèrum, aquestos van créixer en suspensió i varen adquirir una morfologia semblant a les neurosferes.

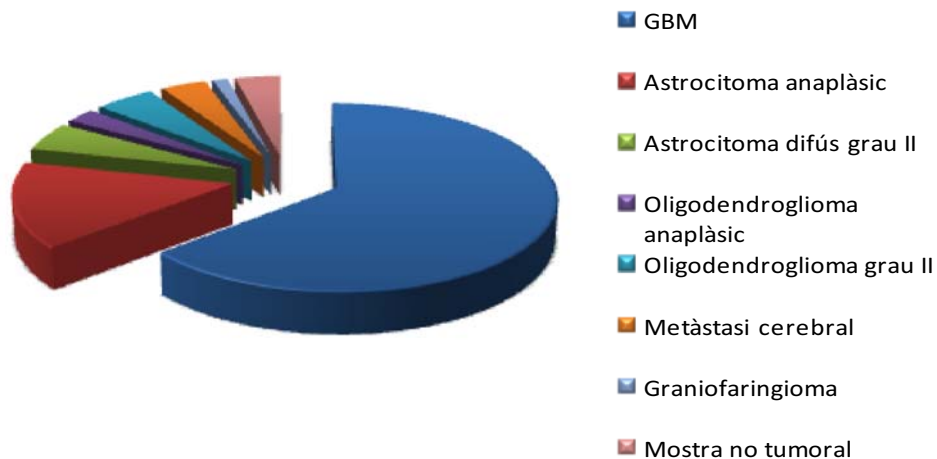


Figura 1. Diagnòstic histològic de les mostres tumorals processades per l'establiment de cultius primaris.

Com a part del protocol, es va determinar el pes de cada mostra abans d'iniciar el seu processament. Aquesta mesura del pes ens permetia ajustar la quantitat de col·lagenasa I necessària per a la disgregació enzimàtica del tumor. El rang de pes de les mostres va oscil·lar entre 30 mg i 1820mg i la seva distribució es troba detallada a la Figura 2. En 10 casos no va

ser possible obtenir el pes degut a que les mostres procedien de biòpsia esterotàxica, i al ser tant petites, sols es va realitzar disgregació mecànica.

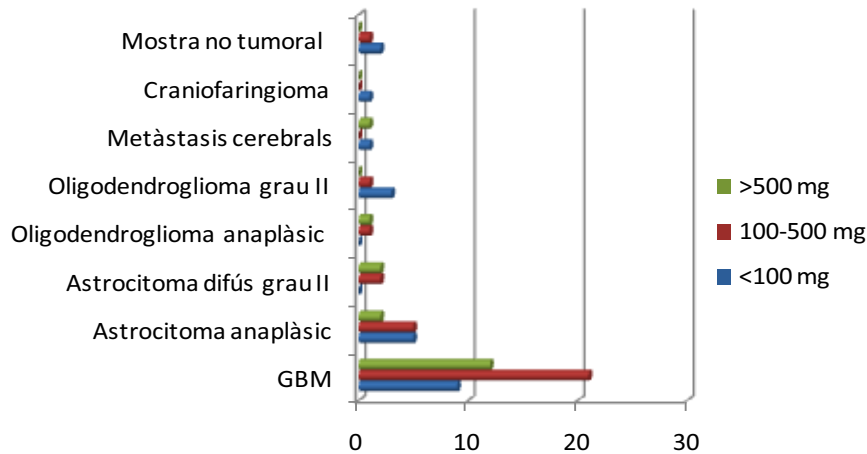


Figura 2. Gràfica de distribució de pesos dels diferents tipus histològics processats (n=70).

1.3 Establiment de cultius primaris amb sèrum

Es van establir cultius primaris de gliomes a partir de mostres tumorals de pacients intervinguts en el Servei de Neurocirurgia de l'Hospital de Bellvitge (HUB) amb la sospita diagnòstica de GBM o glioma d'alt grau. Per a l'establiment dels cultius es va portar a terme un protocol de disgregació mecànica seguit d'un tractament enzimàtic per tal obtenir cèl·lules aïllades (veure apartat de materials i mètodes). A més, en alguns casos es va cultivar directament part de la mostra després de la disgregació mecànica (explants).

El protocol que s'ha utilitzat s'ha anat modificant en relació als resultats que anàvem obtenint, amb l'objectiu d'optimitzar i millorar el rendiment dels cultius. Inicialment, es dipositava la mostra tumoral en una placa de Petri, (prèvia mesura del pes), es realitzava un rentat amb PBS i posteriorment, s'afegia medi HBSS per a facilitar-ne la disgregació. Amb l'ajuda d'un bisturí i unes pinces i, amb molta cura, es disgregava el teixit de forma mecànica, intentant obtenir fragments d'una mida el més petit possible (1 mm² o inferior aproximadament). Després, es recollia el medi i els fragments amb una pipeta de 10ml i es

dipositaven en un tub falcon de 50ml, on s'afegia col·lagenasa I (a una concentració final de 200U/ml), per a procedir a la disgregació enzimàtica del teixit. En aquest moment, amb una pipeta de 5ml es realitzaven petits pipetetjos amunt i avall per augmentar la disgregació mecànica i facilitar la feina de la col·lagenasa I. La mostra tumoral s'incubava amb agitació durant 1 hora a 37°. Al finalitzar el temps de la incubació, si es visualitzava que el teixit estava ben disgregat es procedia a centrifugar a 1200 rpm durant 5 minuts, s'eliminava el sobrenedant i es resuspensia en medi DMEM complementat amb 10% iFBS, seguit d'un nou rentat i centrifugació en les mateixes condicions. Finalment ,la mostra ja disgregada era plaquejada amb medi DMEM complementat amb 10% iFBS en una o varies plaques de 60mm en funció de la quantitat de teixit inicial i era incubat a 37° amb 5% de CO2. En el cas que després de incubar amb col·lagenasa I algun fragment fora encara visible, sota campana de cultius amb una pipeta de 1 ml es realitzaven pipetetjos amunt i avall per facilitar la digestió i deixaríem incubant la mostra 30 minuts més.

Al dia següent, els cultius primaris eren observats al microscopi òptic i, normalment, després de 24 hores de plaqueig, ja s'observaven algunes cèl·lules adherides a la placa. En molts casos, s'acostumava a retirar el sobrenadant, es feia un rentat amb medi de cultiu per eliminar els eritròcits romanents, que acostumaven a dificultar la observació i viabilitat del cultiu primari. A partir d'aquest punt, la renovació parcial del medi tenia lloc cada 2-3 dies. La raó d'aquest procediment era evitar la pèrdua dels factors de creixement que les pròpies cèl·lules en cultiu anaven sintetitzant i excretant al medi.

Una de les millores que es va introduir en el protocol va ser l'ús d'un tampó per rompre els eritròcits, que s'utilitzava després de la primera centrifugació postdisgregació enzimàtica i això va permetre el plaqueig del cultiu primari molt més net, amb un nombre mínim d'eritròcits. Aquest procediment va augmentar la eficàcia dels cultius primaris.

Seguidament, es mostren diverses imatges de l'aspecte del cultius primaris amb sèrum establerts al laboratori (Figura 3).

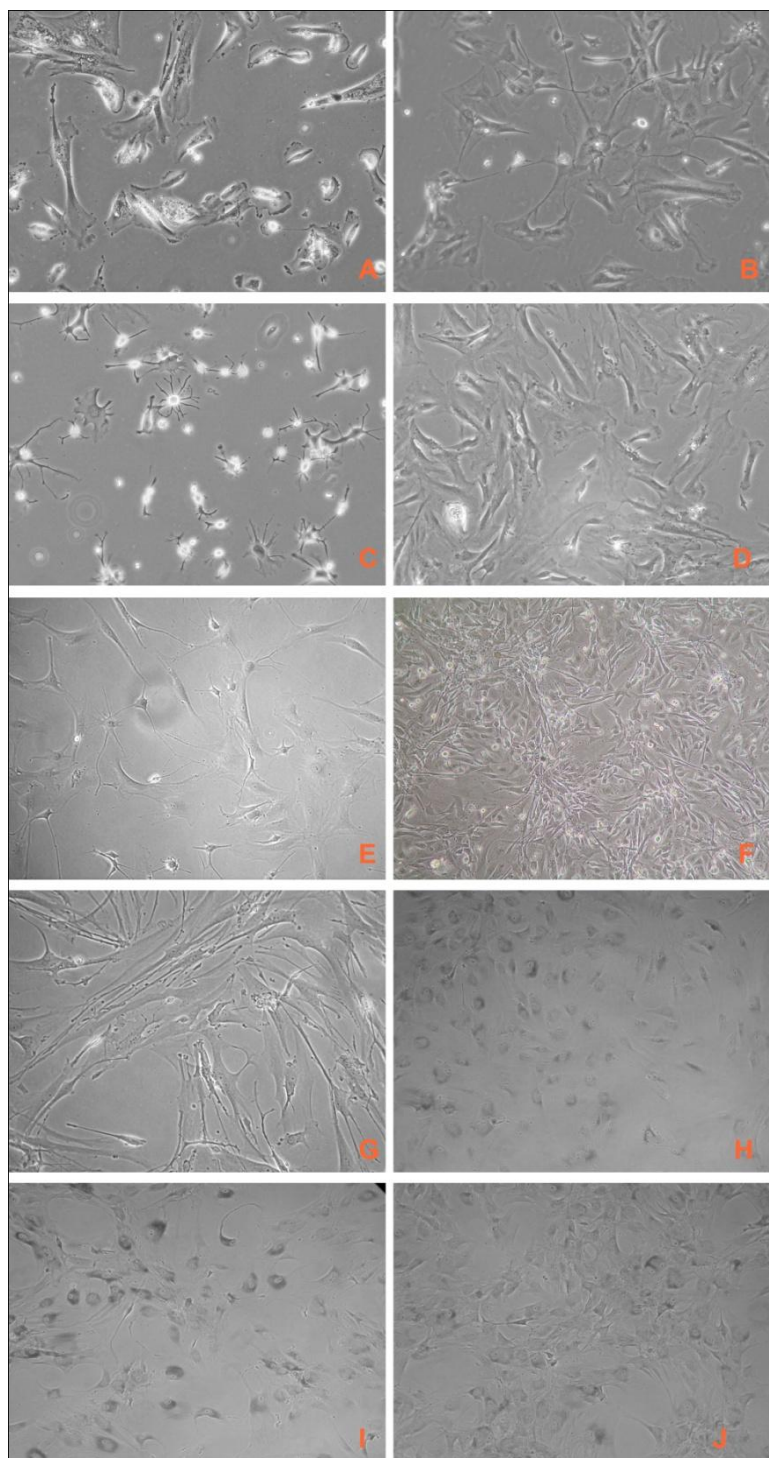


Figura 3. Cultius primaris establerts, imatges obtingudes per microscopi òptic 10x. A) 01/0105; B) 03/0305; C) 05/0505; D) 21/0106; E) 33/1306; F) 35/1506; G) 36/1606; H) 45/0108; I) 47/0308; J) 51/0708.

1.3.1 Obtenció d'explants

En alguns casos, es va cultivar una petita part de la mostra directament després de la disgregació mecànica sense disgregació enzimàtica (explants cel·lulars). L'objectiu era veure la capacitat invasiva i de migració de les cèl·lules tumorals. Per a l'èxit d'aquest explant va ser necessari obtenir fragments el més petit possible amb una superfície aproximada d'un mm².

Els fragments adients es van col·locar amb unes pinces estèrils a la paret de flascons de cultiu de 25cm², on prèviament ja havíem afegit medi.. Aquestos flascons es dipositaven a l'incubador a 37°C, en posició vertical, sense que el medi entrés en contacte amb l'explant durant 2-3hores aproximadament, per facilitar-ne l'adhesió. Passat aquest període de temps, els flascons es col·locaven en posició horitzontal. En un període que no acostumava a excedir les 48-72 hores es començava a visualitzar al microscopi òptic l'aparició de creixement cel·lular a partir d'explant. A continuació, es mostren diverses imatges d'explants cel·lulars obtinguts al laboratori.

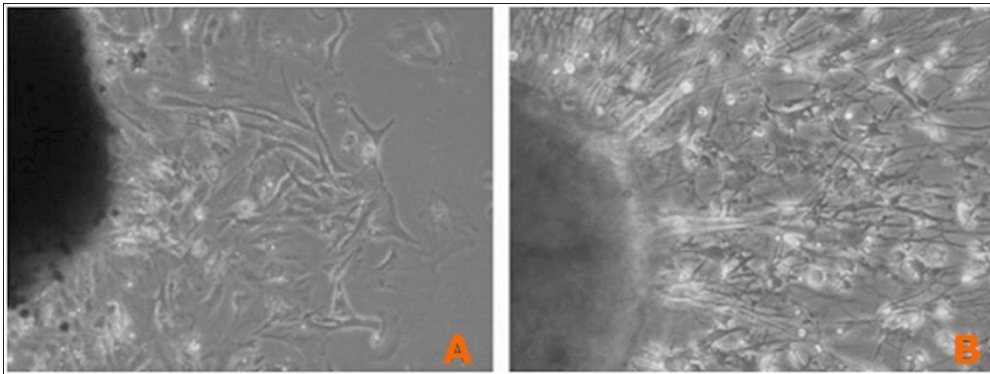


Figura 4. Imatges d'explants cel·lulars visualitzats amb el microscopi òptic A) Explant cel·lular de la mostra tumoral 0101/05 a 10X B) Explant cel·lular de la mostra tumoral 0202/05 a 20X.

1.3.2 Manteniment cel·lular i criopreservació

Quan la confluència del cultiu primari era de un 80-90% de densitat cel·lular, transferíem les cèl·lules a plaques o flascons d'una mida superior, amb l'ajuda de tripsina o *cell scraper*. Es contaven les cèl·lules viables amb una cambra de Neubauer i si el nombre era suficientment alt (al voltant del milió), es passaven la meitat a una placa nova, i amb l'altra meitat es realitzava un stock per a congelació (FBS 90% i DMSO al 10%), que ens assegurava el poder treballar amb el cultiu més endavant. Els cultius primaris eren congelats a passes baixes amb l'objectiu d'evitar que la transferència cel·lular d'una placa a un altre induís l'adquisició de noves alteracions gèniques que ens modifiquessin el comportament cel·lular del cultiu inicial.

La viabilitat cel·lular després del procés de descongelació va ser bastant alta, al voltant del 80-90%. El creixement dels cultius descongelats no es veia afectat en quan al ritme de divisió cel·lular i morfologia que sempre va ser el mateix que el previ a la congelació. A continuació, es mostren 2 imatges del mateix cultiu abans de ser congelat i després del procés de congelació i descongelació, observant-ne que la morfologia cel·lular no s'altera.

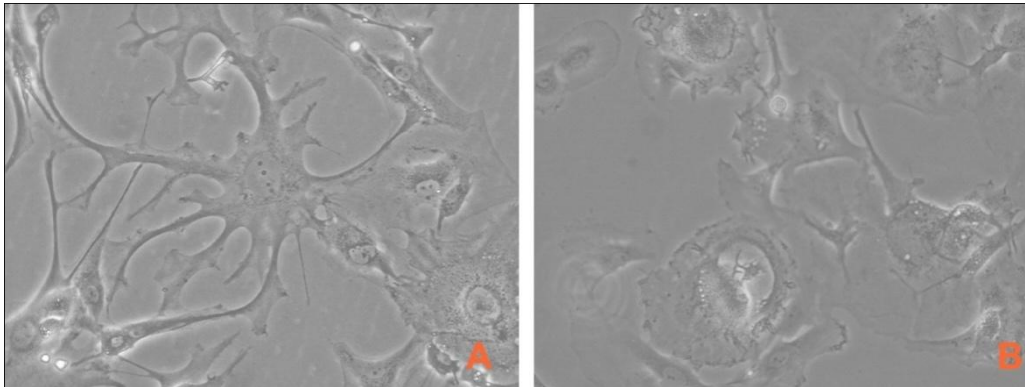


Figura 5. Cultiu primari 03/0305 A) Aspecte cel·lular abans de la congelació. B) Després de la congelació.

1.3.3 Morfologia del cultius primaris

La denominació multiforme dels glioblastomes deriva de la primera descripció histopatològica caracteritzat per morfologies diverses i la presència d'una població cel·lular heterogènia. En els cultius establerts s'ha observat que difereixen uns dels altres en la morfologia cel·lular, no seguint un patró determinat, observant-se cèl·lules de diferents mides, morfologies i complexitats. En alguns casos les cèl·lules recordaven la morfologia dels astròcits madurs, on la presència de múltiples prolongacions llargues i fines caracteritzen aquest tipus cel·lulars. En aquest sentit, la figura 6A es mostra un grup de cèl·lules que recorda la morfologia d'un astròcit fibrós, mentre que la figura 6B la tipologia cel·lular es semblant a la d'un astròcit protoplasmàtic. Altres cultius primaris recordaven més cèl·lules de la oligodendroglia per la presència de prolongacions llargues i escasses (Figura 6 C). A més, també es van observar cultius sense cap evidència morfològica que recordes el seu origen neuroglial, amb cèl·lules amb una morfologia aplanada que ocupaven una gran superfície dins la placa de cultiu (Figura 6D).

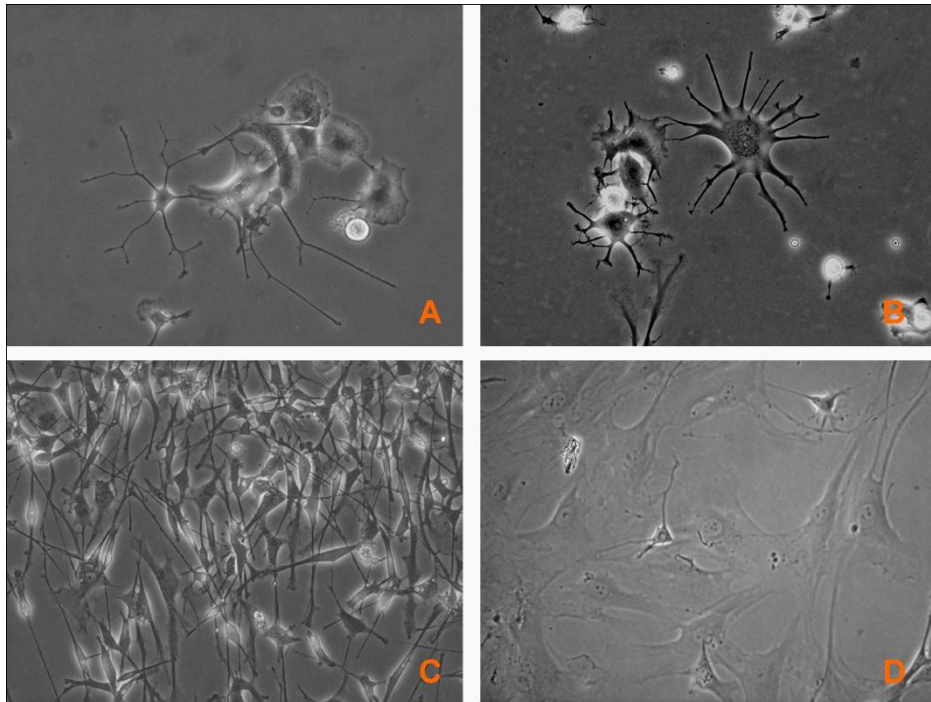


Figura 6. Imatges representatives de la diversitat de morfologies en cultius primaris de glioma obtingudes amb el microscopi òptic 20x. Cultius primaris 04/0405 (A), 05/0505 (B) 06/0605 (C) i 33/1306 (D).

1.3.4 Disposició cel·lular dins la placa de cultiu

Els cultius cel·lulars de glioma establerts al laboratori adopten diferents disposicions espaials en la placa de cultiu. Així, vàrem observar cultius que formaven una mena de xarxes cel·lulars, on s'observava la formació d'uns "botons" o acumulacions de cèl·lules amb una densitat cel·lular superior que en altres àrees de la placa. A l'hora de ser tripsinitzada d'aquestes acumulacions cel·lulars presentava una major dificultat per a la seva disgregació (Figura 7A). Aquesta disposició recorda la morfologia cel·lular que presenta la línia de glioma U87-MG.

Per altre banda, altres cultius primaris establerts van créixer formant una monocapa cel·lular, sense arribar a fer xarxes cel·lulars (Figura 7 B), molt més semblant a la disposició que adopta la línia de glioblastoma T98G.

En altres ocasions, cèl·lules amb morfologia aplanada ocupaven el llit de la placa de cultiu formant una monocapa, i altres cèl·lules més proliferatives i de mida més petita s'observaven creixent formant agrupacions cel·lulars sobre la monocapa .

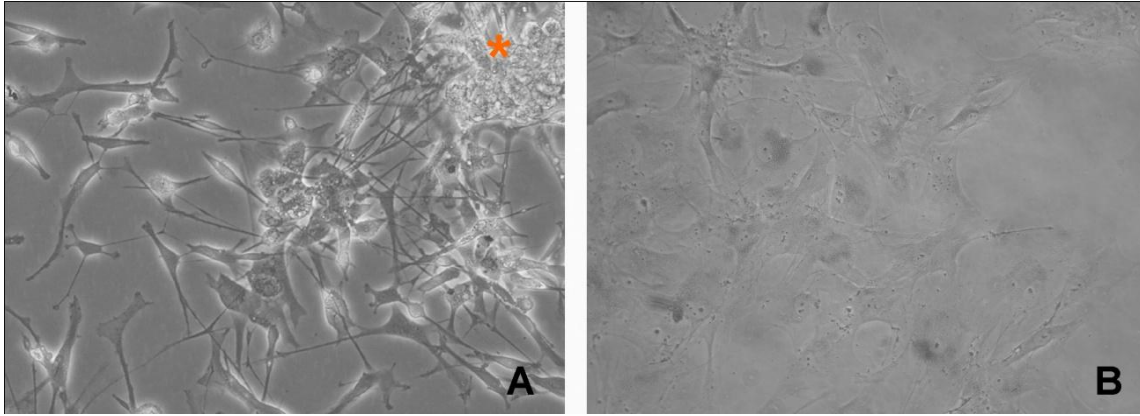


Figura 7. Creixement dels cultius primaris A) Cultiu primari 06/0605, creix formant *clústers* o botons cel·lulars (indicat amb un asterisc) B) Cultiu primari 51/0708, creix formant una monocapa cel·lular. Observacions realitzades al microscopi òptic 20x.

1.3.5 Caracterització dels cultius primaris : Inmunocitofluorescència.

Per una millor caracterització dels cultius primaris es van realitzar estudis mitjançant immunocitofluorescència per marcadors específics: GFAP, vimentina, EGFR i p53. Per poder realitzar la immunocitofluorescència es van tractar cobreobjectes rodons amb poli-lisina per facilitar l'adherència cel·lular al vidre. Com a marcadors de cèl·lula glial es van utilitzar GFAP (proteïna àcida fibrillar glial) i vimentina. Les dues proteïnes formen part dels filaments intermedis que s'expressen de forma conjunta durant el desenvolupament en cèl·lules glials immadures així com en línies cel·lulars de glioma. En les primeres fases del desenvolupament, els astròcits immadurs majoritàriament expressen vimentina, mentre que al final del procés l'expressió de vimentina és desplaçada per la de GFAP en cèl·lules astroglials diferenciades. No obstant, encara es poden trobar astròcits madurs que expressin vimentina, així com en cèl·lules tumorals. Amb el increment del grau de malignitat tumoral es va perdent l'expressió de GFAP (Hilbig A, 2006; Shiras A, 2003; Rutka JT, 1997)

La figura 8 mostra l'expressió de vimentina (vermell) i GFAP (verd), en cultius primaris de glioma. L'expressió de GFAP és va trobar d'una manera uniforme en quasi totes les cèl·lules, mentre que l'expressió de vimentina va ser molt més variable, inclús dins el mateix cultiu hi havia zones on el marcatge era molt menys intens i altres amb un marcatge molt marcat. La disminució i, en alguns casos pèrdua del marcatge per GFAP s'associa amb un augment de la diferenciació cel·lular o increment del grau de malignitat tumoral (Shiras A, 2003). Es varen trobar cèl·lules que coexpressaven els dos marcadors, tal com s'observa a la figura 8.

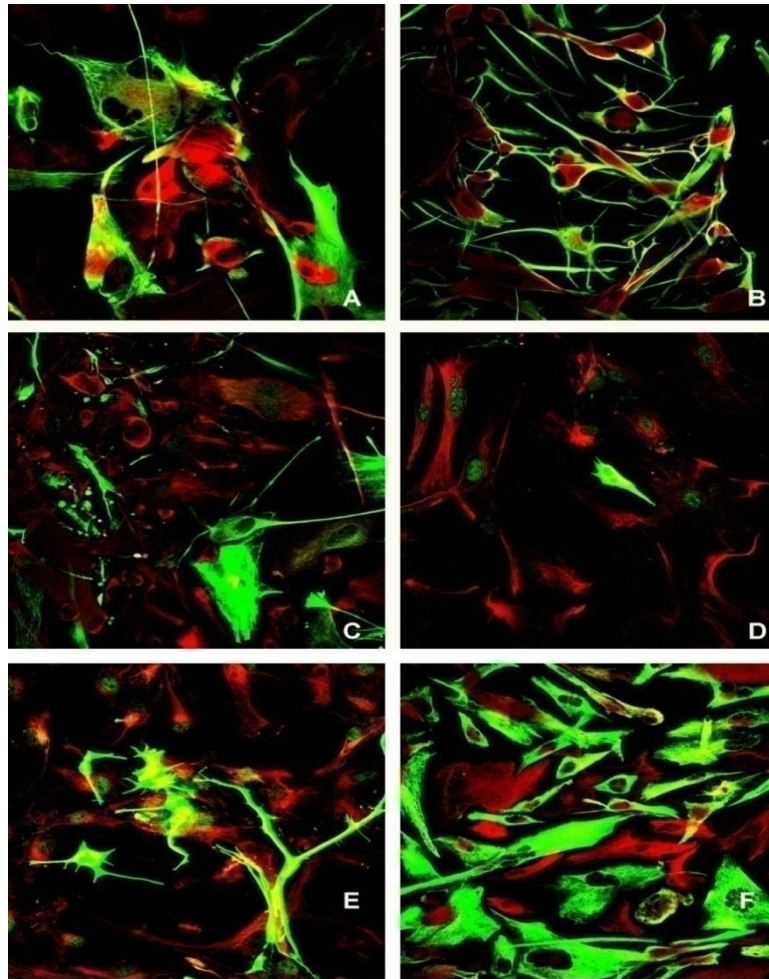


Figura 8. Caracterització de cultius primaris per immunofluorescència amb marcatge amb Vimentina (vermell) i GFAP (verd). Observació amb microscòpia confocal on la colocalització s'observa de color groc 63X. Cultius primaris 03/03 05 (A), 05/0505 (B); 23/0306 (C); 27/0706 (D); 33/1306 (E) 35/1506 (F).

La figura 9 mostra l'expressió d'EGFR (verd, A-D) i l'expressió de p53 (vermell G-J) en cultius primaris de glioma. Aquestes dues proteïnes formen part de vies de senyalització alterades en els GBMs. La via de l'EGFR, és la via més freqüentment mutada durant la formació del GBMs primaris, mentre que la via de p53 juga un paper clau en el desenvolupament del GBMs secundaris. Les alteracions en aquestes proteïnes (EGFR i p53) són gairebé mútuament excloents (Ohgaki H,2009)

L'anticòs per avaluar l'expressió d'EGFR marca tant la proteïna normal com la proteïna mutada (EGFRvIII). La positivitats en el marcatge dels cultius primaris 02/0205, 03/0305 i 35/1506 (Figura 9 A, B i C, respectivament) suggereix que EGFR es troba altament expressat. Pel contrari, en el cultiu 23/0306 (Figura 9 D) el marcatge es inapreciable. Per altra banda, el

marcatge positiu per a p53 podria indicar una possible mutació gènica, ja que en condicions normals la proteïna p53 té un recanvi molt ràpid i no s'expressa de forma basal. Els cultius primaris 23/0306 i 35/1506 són positius per al marcatge de p53 (Figura 9 I i J, respectivament (la seqüenciació de p53 va concloure que el cultiu 23/0306 tenia una mutació a l'exó 8, en el codó 306 (R306X); i el cultiu 35/1506 era portador d'un polimorfisme a l'exó 4 en el codó 72 que dona lloc a un canvi d'aminoàcid (R72P). Veure resultats objectiu 2).

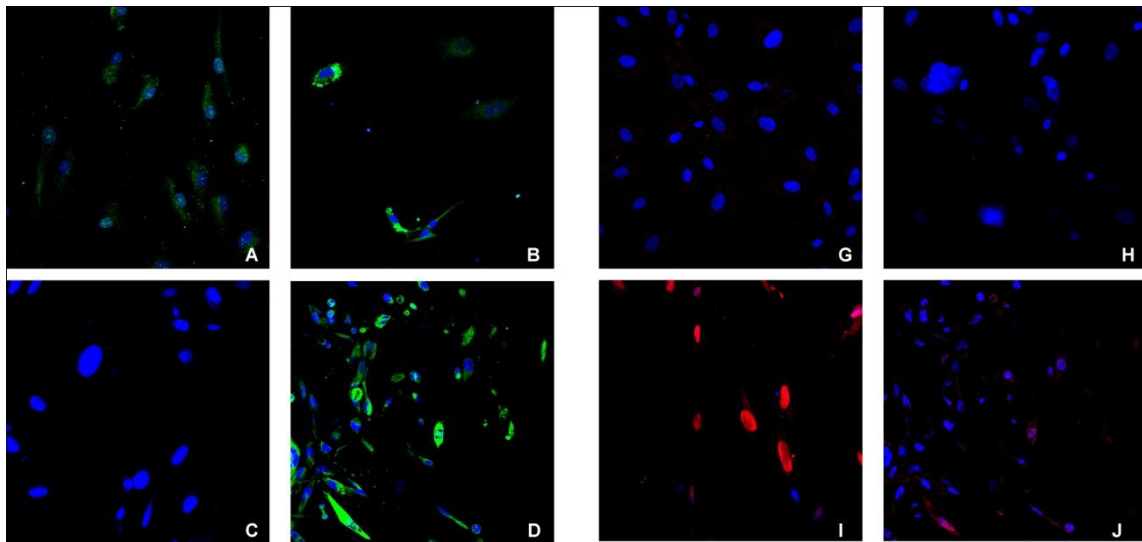


Figura 9. Caracterització de cultius primaris per immunofluorescència amb marcatge amb EGFR (verd) i p53 (vermell). El color blau correspon a la tinció nuclear amb Topro III. Cultius primaris 02/0205 (A, G), 03/0305 (B, H); 23/0306 (C, I); 35/1506 (D, J).

1.4 Cultius primaris de glioma sense sèrum

Els GBMs es caracteritzen per ser tumors que envaeixen les regions peritumorals de teixit cerebral normal el que dificulta l'eradicació completa de les cèl·lules tumorals amb el tractament estàndard. A més, tal com s'ha comentat a la introducció, els GBM recorren després del tractament en més del 98% dels casos a la mateixa zona on es van originar, el que suggereix que una petita fracció de cèl·lules resistents al tractament podria ser la responsable de la recidiva. Tal com s'ha comentat a la Introducció, aquesta subpoblació podria correspondre a les cèl·lules iniciadores de tumor (TIC), anomenades així per la seva capacitat per induir tumors en ratolins immunodeprimits (Frosina G, 2009).

1.4.1 Establiment de cultius primaris de cèl·lules iniciadores de tumors (TIC)

Els cultius primaris de TIC es varen establir a partir de mostres tumorals de pacients intervinguts en el Servei de Neurocirurgia de l'Hospital de Bellvitge (HUB) amb la sospita de glioma maligna. Per a l'obtenció dels cultius es va realitzar inicialment una disgregació mecànica seguida d'un tractament enzimàtic per obtenir cèl·lules aïllades. El protocol empleat per aïllar i cultivar cèl·lules mare tumorals provinents de gliomes s'ha anat modificant des del seu inici el que ens ha permès l'optimització i millora de l'establiment d'aquest tipus de cultius.

Inicialment la metodologia empleada va ser la mateixa que pels cultius primaris amb sèrum, amb la diferència que el teixit disgregat es filtrava a través d'una malla de 70 μ M abans de ser plaquejat i el medi de cultiu era DMEM/F12 que contenia factors necessaris per la proliferació i enriquiment de cèl·lules TIC (b27, FGF i EGF). Un dels inconvenients d'aquesta metodologia era la gran quantitat de fibres no digerides i d'eritròcits que varen trobar al medi de cultiu i que dificultaven l'observació rutinària del cultiu, pel que era necessari la realització de diversos rentats.

Els resultats van ser molt variables, amb cultius que una vegada sembrats, començaven a dividir-se i d'altres que no proliferaven adequadament. En els cultius que es varen desenvolupar de forma correcta, una majoria va tenir la capacitat de començar a adoptar una morfologia que recordava les neurosfères (Figura 10).

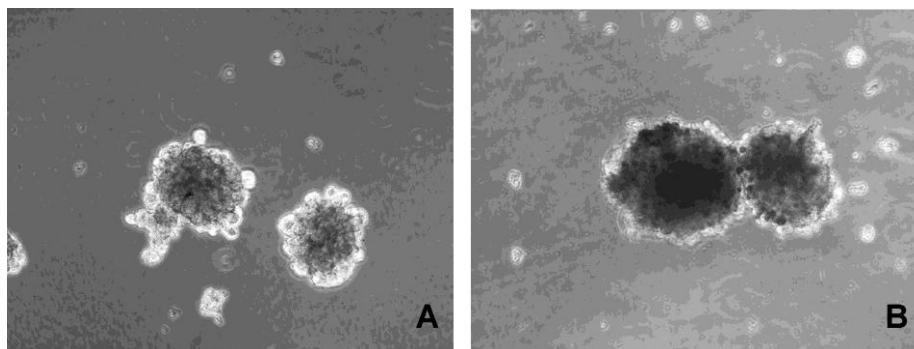


Figura 10. Formació de neurosfères. Cultius primaris 52/0808 (A) i 54/1008 (B), observats al microscopi òptic10x.

Malgrat el desenvolupament i creixement de neurosfères, aquestes no van ser tal i com s'esperaven, ja que les cèl·lules que conformaven la neurosfera adquirien una coloració fosca i poc birefringent, amb la dificultat afegida que les neuroesfères no es disgregaven

completament amb la pipeta. A més, al observar-les més detingudament semblava com si petits fragments cel·lulars es trobessin adherits a la pròpia neurosfera.

El protocol inicial, va patir diverses modificacions amb la finalitat de millorar l'eficiència tant per establir el cultiu com per al manteniment del propi cultiu. A través d'una recerca bibliogràfica, una de les primeres modificacions que es va introduir va ser la substitució de la col·lagenasa I per papaïna com a enzim de disgregació tumoral. La utilització de la papaïna va iniciar-se amb el cultiu 57/1208, però no va arribar a créixer correctament probablement, en part, perquè es tractava d'un oligodendroglioma grau III i aquests tumors són gairebé impossibles d'establir i mantenir en cultiu, a diferència del que té lloc amb el glioblastoma multiforme. Aquesta modificació en el protocol va permetre establir cultius de TIC de les mostres 67/0709, 68/0809 i 69/0909 però sols inicialment, ja que no s'aconseguia el manteniment ni expansió dels mateixos, malgrat tractar-se de GBMs.

Per aquest motiu, per tal de millorar l'eficiència dels cultius de TIC vàrem contactar amb el grup liderat per la Dra. Rosella Galli del Neural Stem Cell Biology Unit, en el DIBIT-San Raffaele Scientific Institute, a Milà (Itàlia), el qual tenia una dilatada experiència en establir aquest tipus de cultius primaris (Galli R,2004) i, ens va donar l'oportunitat de realitzar una estada al seu laboratori, que va servir per familiaritzar-se amb la metodologia emprada per ells.

El mètode finalment emprat per a l'establiment de cultius primaris de TIC va consistir en un primer rentat de la mostra amb PBS 1x estèril amb la finalitat d'eliminar el màxim nombre glòbuls vermells, seguit de, amb l'ajuda d'un bisturí i unes microtissores, una disgregació mecànica acurada per obtenir fragments tumorals de mida molt petita. Seguidament, s'afegia el tampó de digestió que contenia papaïna (47.2mg de papaïna en 50 ml de medi). La mostra es col·locava en un tub de Falcon de 50 ml on es va addicionar DNasa I (concentració final de 0.001%) tot just abans d'incubar durant 20 minuts a 37°C amb un moviment oscil·latori. Després d'aquesta incubació, la mostra era centrifugada i tractada amb un tampó per a lisar els glòbuls vermells. Posteriorment, es filtrava la mostra per a descartar el fragments de teixit sense disgregar. Després de centrifugar, es resuspenia en el medi complet de TIC i es plaquejava a una densitat de 5000 cèl·lules/cm². És important destacar que, per a la millor disgregació de les esferes i afavorir la viabilitat cel·lular, es molt important disgregar les esferes abans que assoleixin una mida de màxima de 100 µM.

El cultiu primari 74/1409 va ser un dels cultius que es va aconseguir establir, mantenir i congelar amb aquest protocol. A diferència dels primers protocols, l'aspecte de les cèl·lules

d'aquest cultiu era birefringent, i les esferes fàcilment disgregables amb l'ajuda d'una pipeta (figura 11).

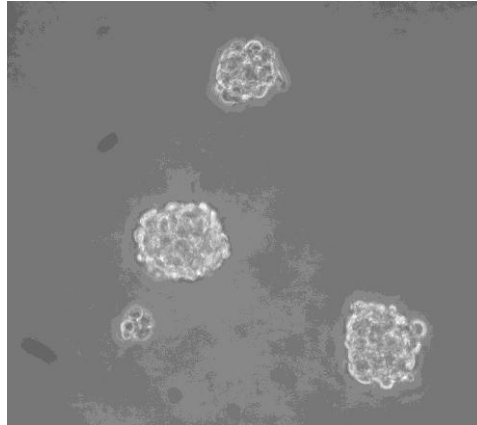


Figura 11. Establiment de cèl·lules mare tumorals en el cultiu primari 74/1409. Formació de neuroesferes observades pel microscopi òptic 40x.

Finalment, en alguns cultius que prèviament havíem processat amb medi amb sèrum es va analitzar la capacitat de créixer en medi sense sèrum. Vàrem observar que aquests cultius tenien capacitat de créixer en flotació i formant neuroesferes. Un dels cultius que es va descongelar va ser el 23/0306 (figura 12), que després d'unes setmanes amb el medi sense sèrum va acabar desenvolupant neuroesferes (Figura 12).

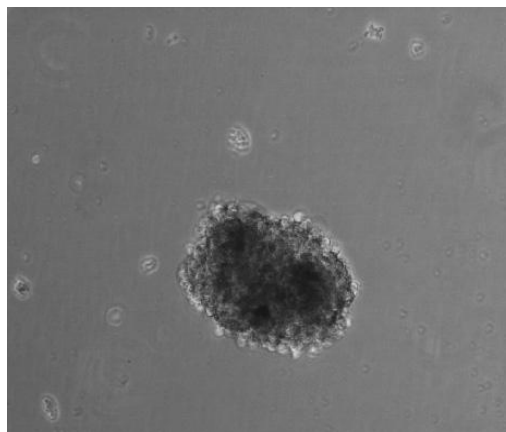


Figura 12. Formació de neuroesferes d'un cultiu prèviament establert amb medi amb sèrum. Cultiu primari 23/0306. Observacions al microscopi òptic 10x.

1.4.2 Manteniment cel·lular i criopreservació de cultius primaris de TIC

Quan es va observar una alta densitat de neuroesferes, aquestes es varen passar a plaques de major mida o es varen congelar amb la finalitat d'emmagatzemar alíquotes per treballar en un futur. Amb l'ajuda d'una pipeta de 5 o 10ml en funció de la mida de la placa, varem pipetejar molt suaument per agafar totes les neuroesferes que es trobaven en suspensió i es varen dipositar en un tub falcon. Es va centrifugar la mostra, i es va eliminar el sobrenedant deixant un petit romanent de medi junt amb el pelet que ens va permetre, amb l'ajuda d'una pipeta de 200µl, disgregar-lo el pelet, i més concretament les neuroesferes. Es va contar en nombre de cèl·lules, i es van congelar entre 300.000-1.000.000 cèl·lules/criovial amb 90% medi de cèl·lules mare i 10% DMSO. Amb les cèl·lules restants es van plaquejar a una densitat de 5000 cèl·lules/cm². És important destacar que, per a la millor disgregació de les esferes i afavorir la viabilitat cel·lular, es molt important disgregar les esferes abans que assoleixin una mida de màxima de 100 µM.

1.4.3 Diferenciació de TICs amb un medi amb sèrum

El cultiu primari 33/1306 es va establir inicialment en un medi que contenia sèrum, on les cèl·lules proliferaven adherides a la placa amb una morfologia que recordava l'origen glial. Posteriorment es va comprovar que com el cultiu 33/1306 (veure apartat 1.4.1) era capaç de proliferar en suspensió i generar neuroesferes (Figura 13A). Vàrem avaluar si eren capaces de diferenciar-se en un medi DMEM que contenia sèrum (iFBS). Les neuroesferes varen ser transferides a un medi que contenia sèrum i observades al microscopi òptic. A les 6 hores en un medi amb sèrum, les neuroesferes es varen dipositar en els fons de la placa, únicament s'observa una cèl·lula diferenciada que surt de una de les neuroesferes (Figura 13B). Per el contrari a les 120 hores amb un medi amb sèrum les neuroesferes han donat lloc a un cultiu adherit, amb una morfologia cel·lular que recorda el moment de l'establiment del cultiu primari (Figura 13C).

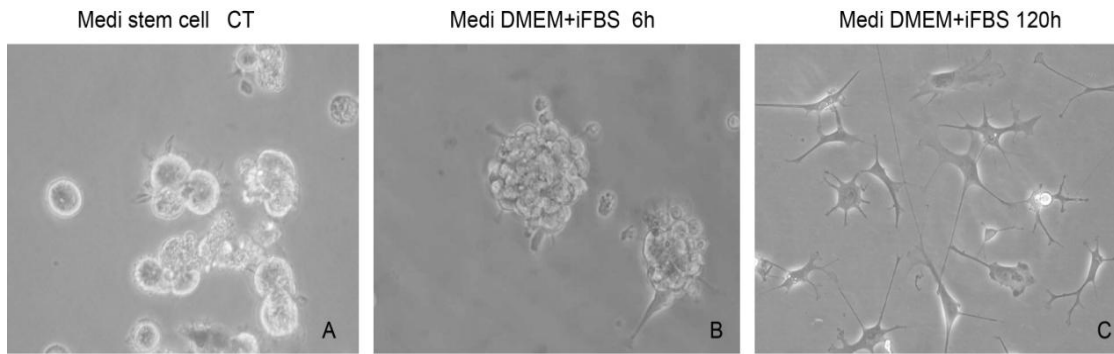


Figura 13. Diferenciació de TICs en el cultiu primari 33/1306, per transferència a un medi amb sèrum

1.4.4 Separació de cèl·lules mare amb el marcador CD133+

El marcador CD133 és una proteïna amb 5 dominis transmembrana expressada en diferents tipus de progenitors com es el cas del cervell humà durant el desenvolupament fetal o en cèl·lules mare hematopoètiques. En tumors cerebrals, les cèl·lules amb una marcatge positiu per CD133 representen una minoria de la població tumoral (Garcia JL, 2010). Es considera que la subpoblació cel·lular CD133+ és aquella amb la màxima capacitat per a generar i mantenir tumors quan s'injecten en ratolins immunodeprimits.

Amb els cultius primaris que proliferaven de forma adequada, es va procedir a la separació de cèl·lules per CD133+ i CD133- amb el objectiu d'avaluar la presència d'aquest marcador, en neurosferes. Un cop marcades amb l'anticòs CD133 associat a microbeats (CD133 MicroBead Kit, Milteny Biotec) es van separar mitjançant el Cell Sorter i cultivades amb medi sense sèrum per separat la subpoblació CD133+ i la CD133- . Per comprovar que el procés de separació de les dues subpoblacions s'havia realitzat satisfactòriament, es va realitzar una RT-PCR de CC133 de les 2 subpoblacions.

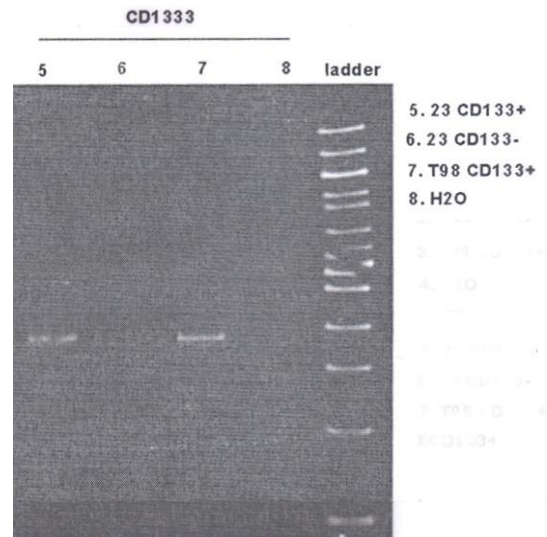


Figura 14. PCR del marcador de cèl·lules mare CD133 (carrils del 5 al 8), realitzat en el cultiu primari 23/0306. Les T98G van servir com a control positiu de l'experiment.

En els carrils 5 i 6 de la figura anterior es mostra, la RT-PCR del gen CD133 realitzat en el cultiu primari 23/0306 després de la separació amb el cell sorter. Es pot concloure que la separació es va portar a terme correctament, ja que la banda que apareix en el carril 5 que correspon a les cèl·lules CD133+ es de la mateixa mida que el control positiu que es troba en el carril 7. Mentre que en el carril 6 les cèl·lules separades com a CD133- realment ho són, perquè no apareix la banda corresponent.

1.5 Factors que limiten l'establiment de cultius primaris de glioma maligne

En l'establiment de cultius primaris de mostres tumorals humanes de glioma d'alt grau ens vàrem trobar en diverses condicions que dificultaven el seu creixement adequat en cultiu. Aquestes factors limitant alguns estaven relacionats amb característiques de la mostra i altres varen ser factors externs.

1.5.1 Factors limitant dependents de la mostra:

1.5.1.1 Mida de la mostra: tal com s'ha comentat a l'apartat 1.2, totes les mostres es van pesar previ al inici del protocol, excepte en el cas de les biòpsies esterotàxiques, que al ser mostres molt petites per tal d'intentar millorar la seva viabilitat es processaven de

forma immediata després de la disgregació mecànica. En cap de les mostres procedents de biòpsia esterotàxica es va poder establir el cultiu primari degut a que la mida de la mostra tumoral era massa petita. A més, les mostres de mida inferior a 100 mg presentaven dificultats a l'hora de garantir l'èxit en el establiment del cultiu. El nombre de cèl·lules tumorals que s'aconseguien aïllar era insuficient per un correcte desenvolupament en les condicions de cultiu, independentment del diagnòstic histològic. En mostres tumorals amb pesos superiors als 100mg, les possibilitats d'èxit en l'establiment de cultius primaris s'incrementaven considerablement.

1.5.1.2 : Diagnòstic anatomopatològic: el diagnòstic histològic va representar un factor clau a l'hora de garantir l'èxit del cultiu. Sols les mostres amb el diagnòstic histològic de GBM varen créixer en cultiu. Cap de les mostres amb els altres diagnòstic que es varen processar va poder ser cultivada amb èxit. En mostres de glioma de baix grau o grau III de malignitat, a pesar d'aïllar cèl·lules i establir el cultiu de forma inicial, les cèl·lules no proliferaven, i s'observava una progressiva vacuolització cel·lular que finalment conduïa a la mort de la cèl·lula, habitualment entre una i 4 setmanes després d'haver estat processats.

1.5.1.3 : Presència de teixit necròtic: la necrosi macroscòpica es una característica freqüent dels GBMs. Per això, en aquells casos en que la mostra que s'havia de processar presentava zones necròtiques, va ser necessari retirar aquestes zones abans de processar la mostra, per tal d'eliminar el màxim la presència de detritus cel·lulars i hematies que dificultaven la correcta progressió del cultiu.

1.5.2 Factors limitant independents de la mostra:

1.5.2.1 Sobreinfecció del cultiu per bacteris o llevats: Els cultius primaris tenen un creixement molt lent, pel que requereixen períodes molt llargs d'estada (en moltes ocasions superior a 5-6 setmanes) del mateix cultiu a l'incubador, fet que augmenta la possibilitat de sobreinfecció.

1.5.2.2 Problemes tècnics derivats de talls de corrent o mal funcionament de l'incubador.

Objectiu 2: Tractament de línies cel·lulars i cultius primaris amb Nutlina-3a

2.1 Introducció

El gen supressor de tumors *TP53* codifica per una proteïna que regula la resposta a l'estrès produït per varis estímuls entre els que s'inclou trencaments del DNA, radiacions UV, agents tòxics o activitat oncogènica. En front aquestes situacions d'estrès cel·lular, p53 actua activant mecanismes de parada de cicle cel·lular i reparació del DNA o, si el dany es massa greu per ser reparat, induint apoptosi o senescència a través d'una xarxa de vies de transducció anomenada via de p53 (Vogelstein B,2000).

En un 35% de GBMs s'ha observat alteració del gen *TP53* en forma de mutacions puntuals o delecions en el cromosoma 17p. Però pot haver-hi altres aberracions en la regulació i senyalització de p53 que atenuïn la seva funció, com per exemple alteracions en el gen *MDM2*, regulador de l'activitat i estabilitat de p53 (Chin L,2008). La Nutlina-3a, es una molècula antagonista de *MDM2*, que actua impedit la interacció entre *MDM2* i p53, donant lloc a l'estabilització i activació de p53.

2.2 Efecte de la Nutlina-3a en el tractament de línies cel·lulars de glioma. Inducció de parada en el cicle cel·lular i apoptosi

En primer lloc, per a determinar si la Nutlina-3a provocava una disminució en la viabilitat cel·lular, es varen tractar amb l'antagonista de *MDM2* dues línies cel·lulars de glioma humà: la línia cel·lular U87-MG, que posseeix un p53 wt i la línia cel·lular T98G que presenta una proteïna p53 no funcional com a conseqüència d'una mutació puntual en el codó 237 del exó 7 (M235I), i la vàrem utilitzar com a control negatiu pel tractament amb Nutlina-3a. Les dues línies cel·lulars varen ser incubades amb diferents dosis de Nutlina-3a que anaven dels 0.5 fins els 20 μ M o amb DMSO com a vehicle (control vehicle) amb un període de tractament de 48 i 96 hores. La metodologia empleada per avaluar la resposta al tractament va ser l'assaig de viabilitat cel·lular per MTT.

A les 48 hores del tractament amb Nutlina-3a s'observà una petita disminució en la viabilitat cel·lular en la línia U87-MG p53 wt (Figura 15A), mentre que no es varen evidenciar canvis significatius en la línia p53 mutada T98G (Figura 15B). Al augmentar el temps

d'exposició amb Nutlina-3a fins a 96 hores, es va evidenciar una disminució progressiva i significativa de la viabilitat cel·lular de forma dosi dependent en la línia U87-MG. La disminució en la viabilitat cel·lular es va mantenir estable al voltant de 40-50% en un interval entre 4 i 10 μ M de Nutlina-3a. En dosi superiors a 10 μ M la viabilitat cel·lular va disminuir fins al 30%. Pel contrari, la línia T98G tampoc va presentar canvis significatius en la viabilitat cel·lular després de la incubació amb l'antagonista de MDM2 durant 96 hores.

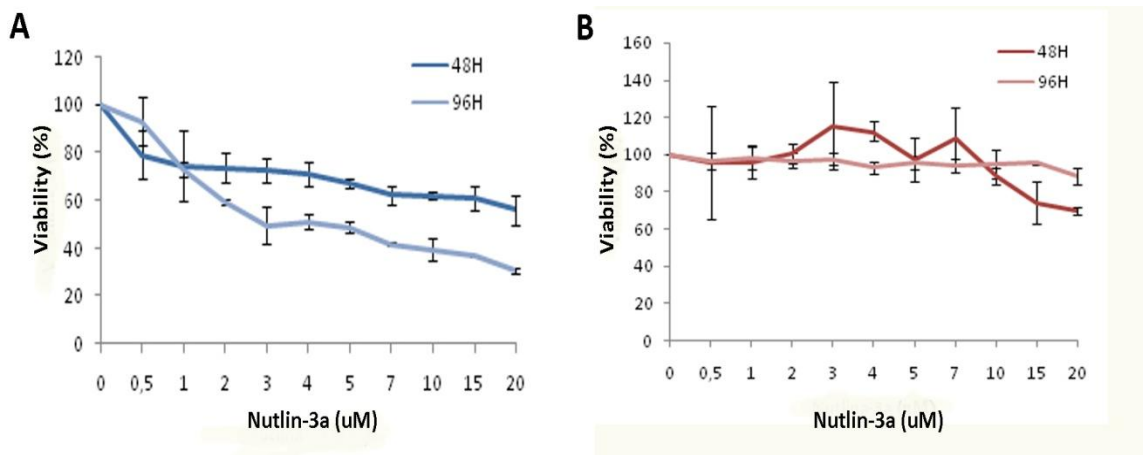


Figura 15. Assaig MTT per la mesura de la viabilitat cel·lular a les 48 i 96 hores després de incubar amb dosis creixents de Nutlina-3a la línia cel·lular U87-MG (A) amb p53 normal i la línia cel·lular T98G (B) amb una proteïna p53 mutada.

Per tal d'avaluar la inducció de p53 amb el tractament amb Nutlina-3a, es va tractar les línies cel·lulars amb 5 i 10 μ M de Nutlina-3a durant 24 hores. Es va analitzar l'expressió de la proteïna p53 mitjançant Western blot i es va observar que el tractament amb Nutlina-3a provocà una acumulació de la mateixa dependent de la dosi de tractament, amb un màxim d'inducció a 10 μ M. En la línia cel·lular T98G, amb una proteïna p53 no funcional, aquesta inducció no es va observar a cap de les dosis de tractament emprades (Figura 16). Estudis previs indiquen que el tractament amb dosis superiors a 10 μ M, a més de inhibir MDM2 de forma específica s'observen també efectes inespecífics independentment de la via de p53 (Vassilev LT,2004). A partir d'aquests resultats els posteriors experiments es van portar a terme amb una dosi final de 10 μ M de Nutlina-3a.

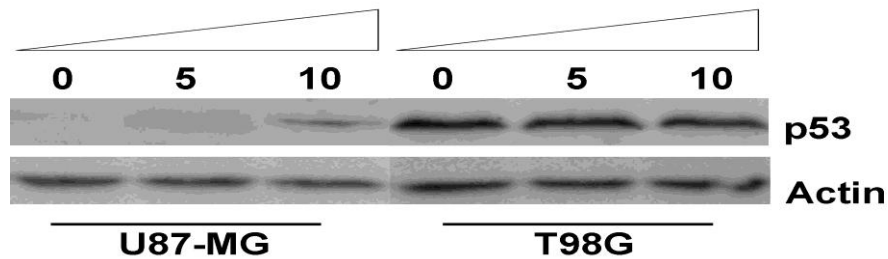


Figura 16. Western blot de línies cel·lulars de glioma. Les cèl·lules varen ser tractades amb Nutlina-3a (5 i 10 μ M) o DMSO (vehicle) durant 24 hores, lisades i analitzades per Western blot.

Per tal d'estudiar de forma més acurada els efectes de la incubació de Nutlina-3a en les línies cel·lulars de glioma, aquestes es van tractar amb l'antagonista de MDM2 a una dosi final de 10 μ M a diferents temps d'exposició de 24 a 96 hores i es va analitzar l'efecte en el número de cèl·lules, mitjançant recompte cel·lular amb assaig d'exclusió de blau de Tripán i en la inducció d'apoptosi, mitjançant citometria de flux.

En la línia cel·lular U87-MG es va observar una disminució significativa del nombre de cèl·lules en relació al control. A les 24 hores de tractament el recompte cel·lular ja mostrava una reducció significativa en relació al control. A les 48 hores d'incubació es va observar un discret augment del nombre de cèl·lules en relació a les 24 hores. Aleshores, el nombre de cèl·lules es va mantenir estable fins a les 96 hores després del tractament amb 10 μ M de Nutlina-3a (Figura 17A).

Per altra banda, en la línia T98G, no es va observar cap efecte significatiu en relació al seu control en el nombre de cèl·lules després del tractament amb Nutlina-3a. En el cas d'aquesta línia, amb el gen *TP53* mutat, la corba control i la corba de les cèl·lules tractades va ser pràcticament igual (Figura 17B).

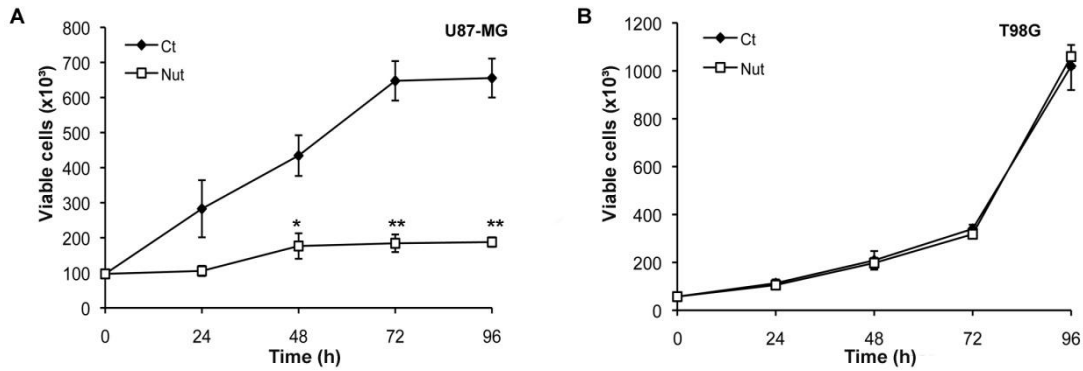


Figura 17. Recompte cel·lular per assaig d'exclusió de blau de Tripán. Les línies cel·lulars van ser tractades amb una única dosi de Nutlina-3a (10µM) i contades al diferents temps d'incubació. Les dades representen la mitjana de 3 experiments independents. **p<0.001 (t de Student).

En quan a la inducció d'apoptosi amb el tractament amb Nutlina-3a, es va observar que, en la línia U87-MG, Nutlina-3a va induir apoptosi de forma significativa al comparar-ho amb el control tractat amb DMSO després de 96 hores d'exposició (Figura18).

Contràriament, en la línia cel·lular amb p53 mutat (T98G), no es va observar cap inducció de mort cel·lular per apoptosi, el que suggereix una resistència a la inhibició de MDM2 (Figura 18).

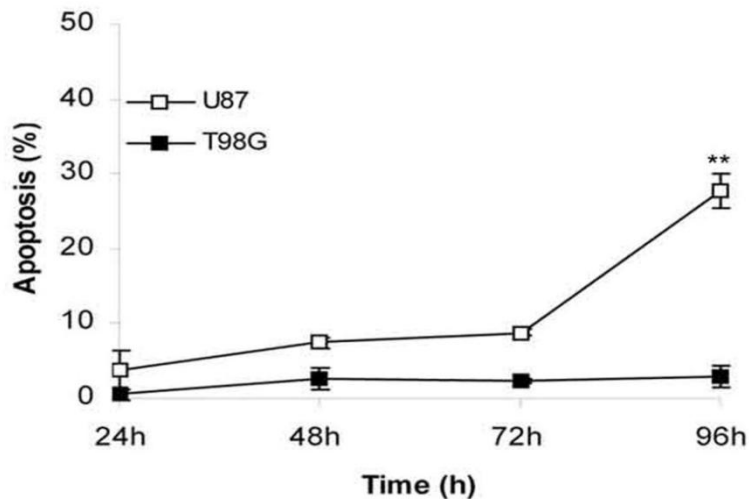


Figura 18. Time course de inducció d'apoptosi, mesurat a partir de l'externatització de la proteïna de membrana Anexina V. Els valors de la inducció d'apoptosi de les cèl·lules tractades amb Nutlina-3a estan representats respecte al control amb DMSO. Les dades representen la mitjana de 3 experiments independents. **p<0.001 (t de Student).

Per tal d'avaluar el mecanisme pel qual Nutlina-3a era capaç d'induir mort cel·lular programada tipus apoptosi en la línia cel·lular U87-MG, es va analitzar el patró d'expressió de diferents gens implicats en el procés d'apoptosi mitjançant RT-MLPA. Per això, es varen incubar les línies cel·lulars de glioma amb 10µM de Nutlina-3a durant 48 i 96 hores i, posteriorment, es va extreure el RNA per analitzar-ho per RT-MLPA.

A la figura 19A s'observa el perfil d'expressió de RT-MLPA de les línies cel·lulars U87-MG tractades amb Nutlina 3a durant 48 i 96 hores, i perfil d'expressió de mRNA de les línies T98G després de ser incubades amb Nutlina-3a durant 48 i 96 hores (Figura 19B).

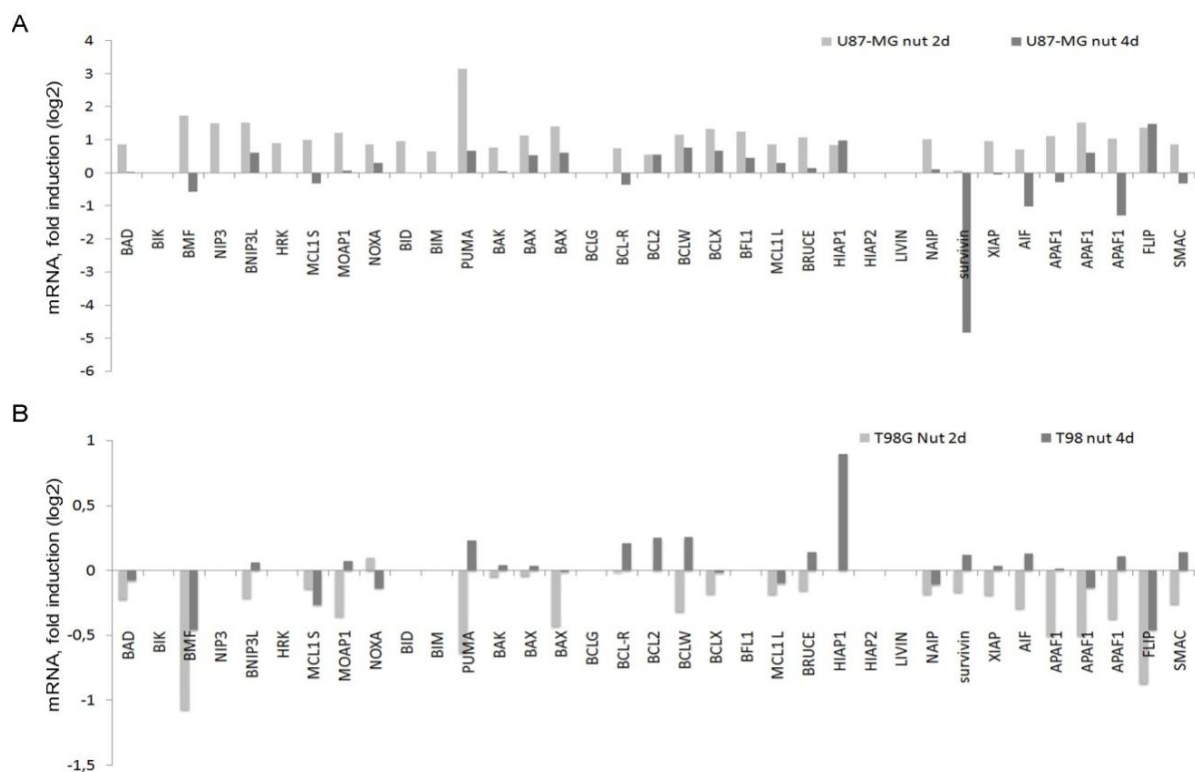


Figura 19. Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA de gens implicats en apoptosi mitjançant RT-MLPA. Quantificació del mRNA expressada en logaritme en base 2 de la increment relatiu en relació als controls (tractats amb DMSO).

A continuació mostrarem els canvis més importants observats en el patró d'expressió de diferents gens implicats en la apoptosi en les línies cel·lulars de glioma després del tractament amb l'antagonista MDM2. En la línia p53 wt U87-MG, el patró d'expressió del mRNA va mostrar canvis en el perfil de diversos gens diana de p53. Després del tractament amb Nutlina-3a durant 48 i 96 hores, PUMA augmentà la seva expressió de forma significativa

en relació al control. De forma molt més discreta, també es va observar un increment de Noxa. A més, Survivina, una proteïna amb funció antiapoptòtica, va disminuir de forma significativa la seva expressió després del tractament. En la línia cel·lular, T98G, no es va observar cap canvi significatiu en el perfil d'expressió del gens implicats en l'apoptosi (Figura 20). Aquestos resultats mostren que el tractament amb Nutlina-3a es capaç d'activar la via intrínseca de l'apoptosi de forma p53 dependent en aquelles cèl·lules amb una proteïna p53 intacta.

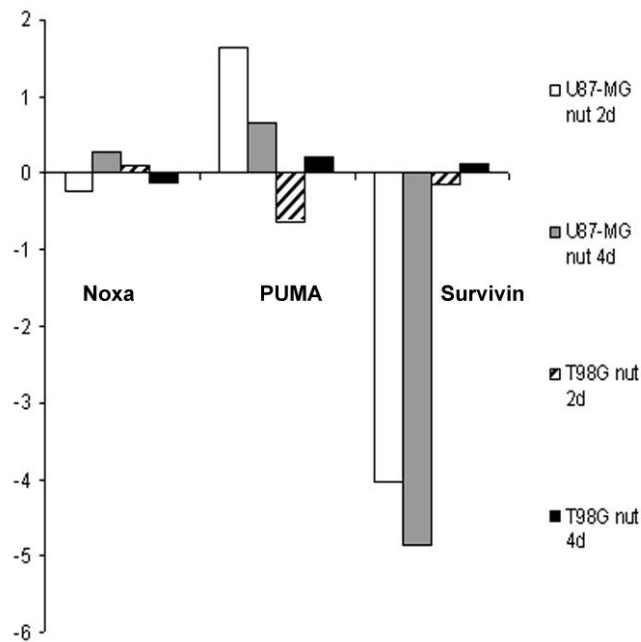


Figura 20. Anàlisi dels nivells de expressió del mRNA de gens implicats en apoptosi mitjançant RT-MLPA. Quantificació del mRNA expressada en logaritme en base 2 de la increment relatiu en relació als controls (tractats amb DMSO).

Finalment, per corroborar que els canvis observats en els nivells d'expressió d'un determinat mRNA es traduïen amb variacions en l'expressió proteica, aquesta es va analitzar mitjançant Western blot a les 96 hores d'incubació amb Nutlina-3a.

La línia cel·lular sensible a la Nutlina-3a (U87-MG), va presentar inducció en les proteïnes p53, MDM2, p21, PUMA i caspasa 3 en la seva forma activa, mentre que els nivells proteics de Survivina varen desaparèixer després del tractament. En la línia cel·lular resistent al tractament (T98G), es va apreciar un discret augment en els nivells d'expressió proteica de p53 després de la incubació amb Nutlina-3a. En concordança amb els resultats previs, no es

varen apreciar induccions en MDM2, p21, PUMA o la caspasa 3 en la seva forma activa ni reducció dels nivells de Survivina (Figura 21).

Aquests resultats demostren que Nutlina-3a indueix mort per apoptosi, inducció de la proteïna propaoptòtica PUMA i disminució de Survivina en les línies cel·lular de glioma U87-MG. A més, les línies p53 mutades T98G són resistent a l'antagonista de MDM2.

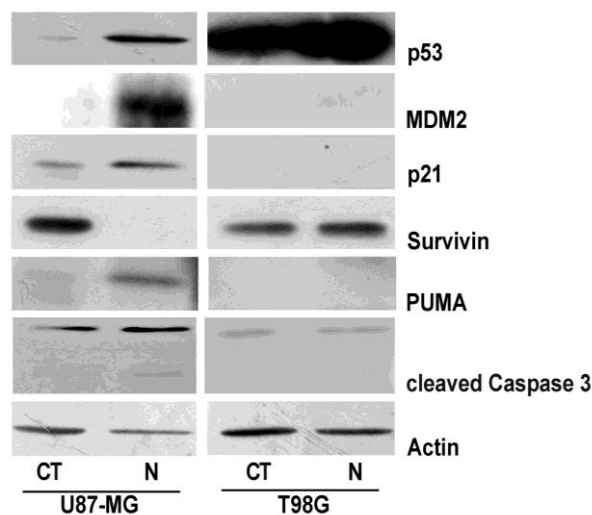


Figura 21. Anàlisi de l'expressió proteica mitjançant Western blot. Les proteïnes van ser avaluades 96 hores després de l'exposició amb Nutlina-3a. CT: Control; N: Nutlina-3a.

2.3 Parada irreversible del cicle cel·lular i senescència en la línia cel·lular U87-MG després del tractament amb Nutlina-3a

Malgrat que a les 24 hores del tractament amb Nutlina-3a es va observar una disminució significativa del nombre de cèl·lules (Figura 17), aquesta no estava relacionada amb la inducció de mort per apoptosi (Figura 18). Per clarificar aquesta discrepància, vàrem estudiar variacions en la distribució de les diferents fases del cicle cel·lular entre les cèl·lules control (DMSO, vehicle) i les cèl·lules tractades amb Nutlina-3a. El cicle cel·lular va ser estudiat per citometria de flux després del tractament amb una dosi de 10µM de Nutlina-3a durant 24 i 96 hores. A les 24 hores del tractament, la línia cel·lular U87-MG va mostrar una disminució en la fase S (del 21% al 3% respecte al control), i augment significatiu en la fase G0/G1 (del 63% fins el 80%) i G2/M (del 12% al 17%). Aquesta parada de cicle en G0/G1 es va mantenir fins a les 96 hores i a més es va observar un discret augment de la fase G2/M i persistència en la disminució de la fase S (Figura 22A). En la línia cel·lular T98G no es varen observar canvis

significatius en cap de les fases del cicle cel·lular després de l'exposició amb Nutlina-3a al comparar-les amb el control tractat amb DMSO (Figura 22B).

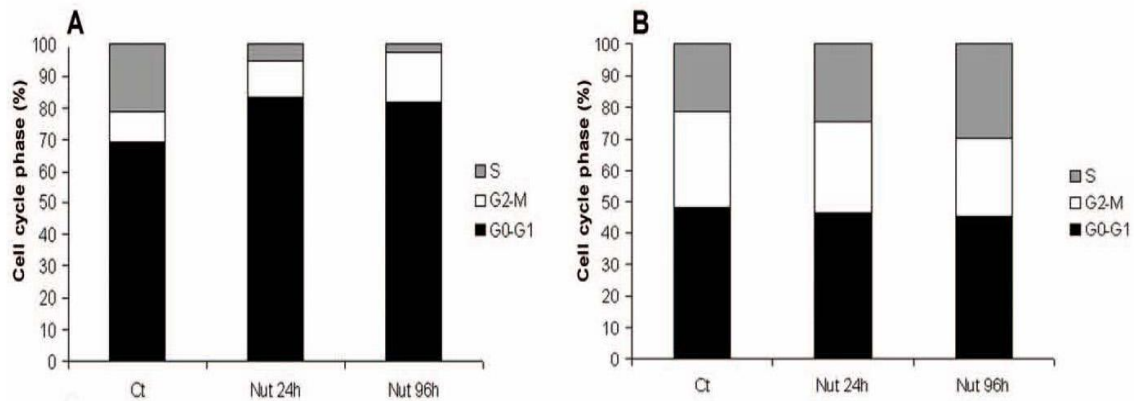


Figura 22. Anàlisi del cicle cel·lular després de l'exposició amb Nutlina-3a (10µM) o DMSO (control), a 24 i 96 hores. Estudi de les fases del cicle mesurat amb iodur de propidi per citòmetria de flux.

Una de les proteïnes implicades en la parada de cicle cel·lular i que es diana de l'activació de la via de p53, és la proteïna p21. p21 té un paper fonamental en la regulació del cicle cel·lular, sent capaç de inhibir la formació de complexos Cdk-Ciclina.

Després d'observar que es produïa una parada del cicle cel·lular de predomini en G0/G1, vam voler estudiar l'expressió proteica de p21 després del tractament de la línia cel·lular U87-MG amb una dosi de 10µM de Nutlina-3a. L'expressió dels nivells de p21 van ser estudiats a diferents temps de tractament (entre 1 i 4 dies). Per tal d'analitzar si l'expressió de p21 es mantenia després de retirar el tractament amb l'antagonista de MDM2, es va analitzar el nivell d'expressió de p21 als 10 dies de cultiu, després de 4 dies de tractament seguit de rentat de les cèl·lules per eliminar la Nutlina-3a i manteniment del cultiu durant 6 dies més.

Els resultats del Western blot van posar de manifest que p21 s'indueix després del tractament durant 24 hores amb Nutlina-3a i es manté elevat fins les 96 hores d'incubació. El nivell elevat d'expressió de p21 va persistir fins als 10 dies després d'eliminar la Nutlina-3a del medi de cultiu (Figura 23).

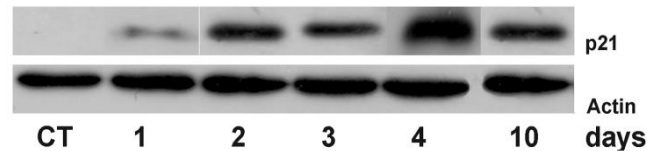


Figura 23. *Time course* de l'expressió proteica de p21 en la línia cel·lular U87-MG, després de la incubació entre 1 i 4 dies; 10 dies correspon a: al dia 4 de tractament s'elimina el medi amb Nutlina-3a i les cèl·lules s'incuben durant 6 dies més amb medi fresc .

Els resultats obtinguts en el Western blot suggereixen que l'aturada del cicle cel·lular persisteix després de la retirada de Nutlina-3a en la línia sensible (U87-MG). Per tal d'avaluar més profundament el caràcter irreversible de l'aturada de cicle com a conseqüència del tractament amb Nutlina-3, vàrem analitzar si l'antagonista MDM2 era capaç de promoure senescència. Per això, es va tractar la línia cel·lular U87-MG amb Nutlina-3a o amb DMSO control durant 4 dies, després es varen rentar les plaques per eliminar la Nutlina-3a i es va afegir medi de cultiu fresc. Les cèl·lules es van mantenir durant 6 dies més sense Nutlina-3a. Passat aquest temps es va realitzar un recompte cel·lular, així com també es va efectuar una tinció amb SA- β GAL per a comprovar si presentaven característiques suggestives de senescència.

La figura 24A mostra que al retirar el tractament amb Nutlina-3a després d'una incubació de 96 hores i posterior manteniment del cultiu amb medi fresc durant 6 dies, no es va induir que les cèl·lules proliferessin de nou al comparar-ho amb el control (DMSO). Es va observar que la disminució en el nombre de cèl·lules respecte al control es del 80% aproximadament. A més, les cèl·lules presentaven en la observació directa al microscopi òptic canvis en el seu aspecte, adoptant una morfologia més estesa i plana suggestiva de senescència. Aquestes cèl·lules varen resultar positives pel marcador de senescència SA- β GAL en un 96% del total als 4 dies de tractament amb Nutlina-3a i es va mantenir en el 93% de les cèl·lules als 10 dies d'incubació després de retirar el tractament(Figura 24B).

Aquests resultats, juntament amb el fet que l'expressió de la proteïna p21 va perdurà elevada fins a 10 dies després del tractament (Figura 23), suggereixen que la parada en el cicle cel·lular va mes enllà de la finalització del tractament i, que per tant, Nutlina-3a indueix senescència en la línia de glioma U87-MG.

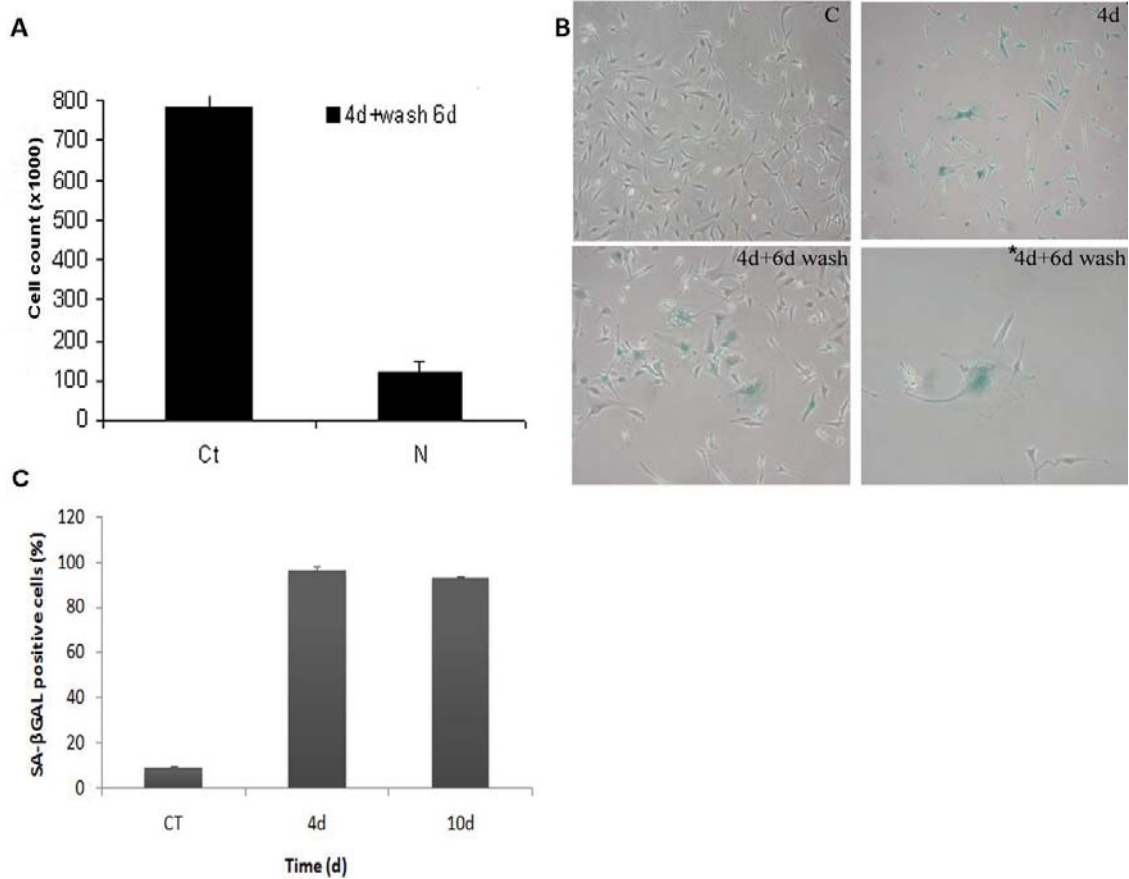


Figura 24. Anàlisi de la senescència cel·lular. A) Recompte cel·lular de la línia de glioma U87-MG tractada amb Nutlina-3a durant 4 dies, rentada amb medi fresc i incubada amb medi de cultiu durant 6 dies més. Els resultats són la mitjana de 3 experiments. B) Fotografies de les U87-MG marcades amb SA-βGal després del tractament amb DMSO (C: Control), o amb 10μM de Nutlina-3a (4d). Les imatges inferiors representen el rentat de la Nutlina-3a i el posterior marcatge amb SA-βGal, C) Gràfica de cèl·lules positives per al marcador SA-βGal a diferents temps de tractament.

Per acabar de confirmar que la parada en el cicle cel·lular esdevenia un procés irreversible, es va fer un assaig de formació de colònies. Es varen tractar les línies U87-MG i les T98G amb una dosi de 10μM de Nutlina-3a i a les 96 hores de tractament es va eliminar la Nutlina-3a del medi i es va afegir medi fresc a les plaques en cultiu. Les colònies formades varen ser contades 6 dies després d'eliminar la Nutlina-3a (10 dies després del plaqueig cel·lular).

Els resultats obtinguts varen mostrar la incapacitat per a formar colònies de la línia U87-MG després d'eliminar la Nutlina-3a del medi en comparació amb la placa control (DMSO). Per altra banda, la línia cel·lular T98G, resistent al tractament, mostrà el mateix nombre de colònies tant en la placa tractada com en el control (Figura 25). La Figura 25B mostra la fracció de supervivència de les cèl·lules tractades amb Nutlina-3a i les cèl·lules

control. En la línia cel·lular U87-MG la fracció de supervivència disminueix de forma dràstica en més d'un 80% respecte al control. El contrari passa en les T98G on després del tractament amb Nutlina-3a la fracció de supervivència és manté igual o inclòs superior a la del propi control, indicant una resistència al mateix.

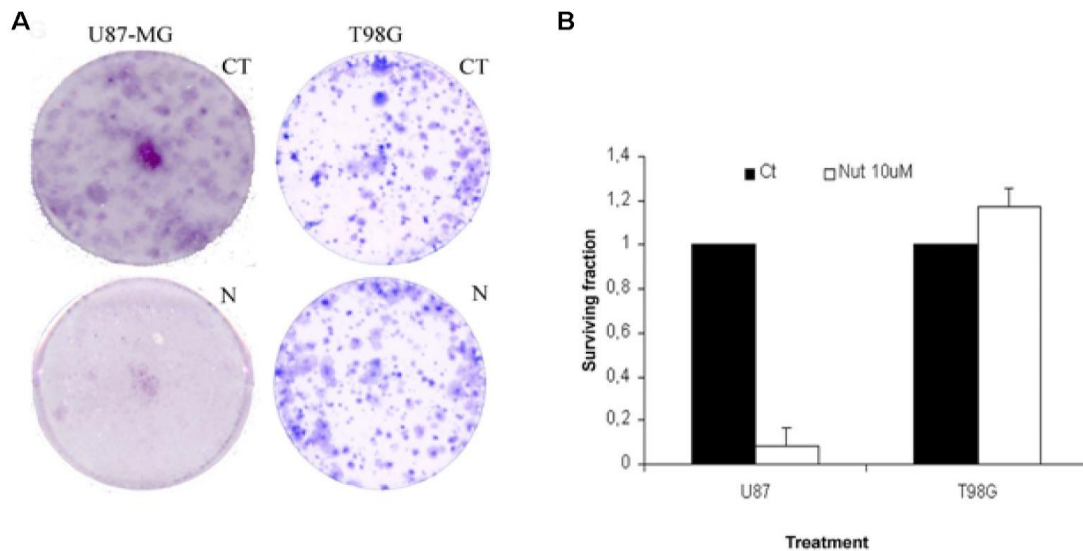


Figura 25. Assaig de formació de colònies. A) Imatges representatives del assaig de formació de colònies (CT: Control; N: Nutlina-3a). B) Gràfica de la fracció de supervivència realitzada a partir de recompte del nombre de colònies en relació al control tractats amb DMSO.

La inducció transitòria de p53 pot ocasionar tant quiescència reversible com senescència irreversible. En la regulació de quin serà el destí final de l'aturada de cicle, la via de mTOR hi participa de forma fonamental. Estudis recents han demostrat que p53 pot inhibir la via de mTOR, la qual està implicada en la regulació de la senescència (Korotchkina LG, 2010). En aquest sentit, per tal de comprovar si la inducció de senescència observada en la línia U87-MG amb el tractament amb Nutlina-3a és dependent de la via de mTOR, es va analitzar l'activitat de la via mTOR després del tractament amb l'antagonista de MDM2. Després del tractament amb Nutlina-3a no es va observar cap variació en la fosforilació de la proteïna S6, fet que suggereix que aquesta via persisteix activa després del tractament amb l'antagonista de MDM2 (Figura 26).

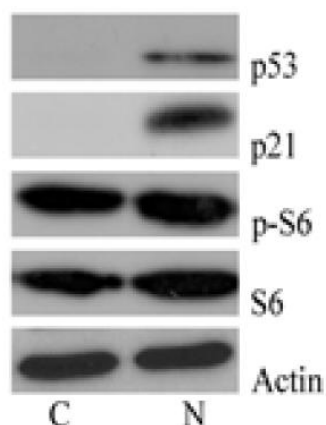


Figura 26. Anàlisi de la via de mTOR per Western blot. Efecte en p53, p21, p-S6 i S6 després del tractament a 48 hores amb una dosi de 10 μ M de Nutlina-3a en les U87-MG. (C: Control no tractat; N: Nutlina-3a)

2.4 El silenciament de p53 però no l'expressió ectòpica de la Survivina protegeix de la citotoxicitat induïda per Nutlina-3a en la línia cel·lular U87-MG

En apartats anteriors hem pogut comprovar que el tractament amb Nutlina-3a en la línia cel·lular U87-MG (p53 wt) indueix una disminució dels nivells d'expressió de Survivina. La Survivina és un proteïna que pertany a la família de les IAPs que actuen com proteïnes antiapoptòtiques mitjançant la interacció i inhibició de les caspases.

Per tal de comprovar si la inducció d'apoptosi observada amb el tractament amb Nutlina-3a estava relacionada amb la inhibició de Survivina, vàrem sobreexpressar Survivina mitjançant transfecció transitòria en la línia cel·lular U87-MG i posteriorment es van tractar amb Nutlina-3a.

Per comprovar l'eficiència de la transfecció es va cotransfectar el vector pcDNA-Survivina i el vector que expressa la proteïna GFP. A les 24 i 48 hores postransfecció, és va avaluar l'eficiència de la mateixa mitjançant observació directa al microscopi de fluorescència i comptatge de cèl·lules marcades i cèl·lules totals (Figura 27). La màxima eficiència de transfecció es va obtenir a les 48 hores (Figura 27D), on es veu més del 50% de cèl·lules transfectades en comparació a la imatge del canal visible (Figura 27C).

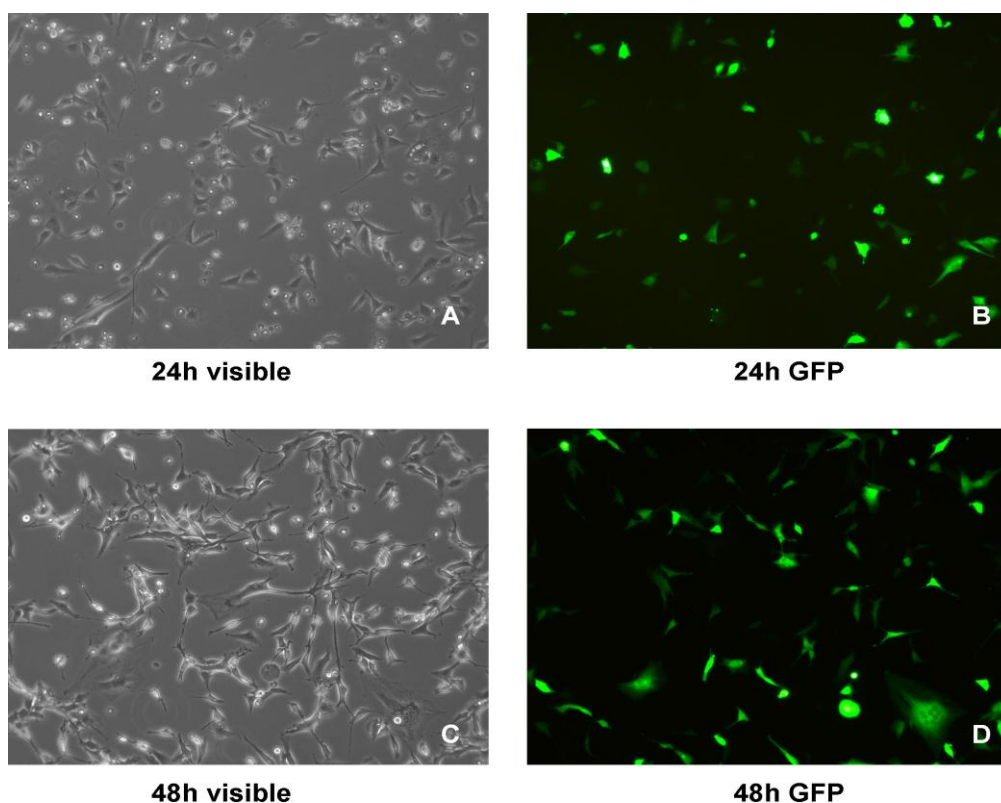


Figura 27. Transfecció de GFP a 24 i 48 hores per obtenir la màxima eficiència. Imatges corresponents al canal visible 10x (A-C). Imatges amb fluorescència que mostren les cèl·lules GFP positives (verd) 10x (B-D).

A les 48 hores posttransfecció, les cèl·lules U87-MG es varen tractar amb 10 μ M de Nutlina-3a durant 72 hores. Els nivells d'expressió proteica analitzats per Western blot mostrà uns nivells més alts de Survivina en les cèl·lules transfectades amb el gen de la Survivina en comparació amb el vector control (Figura 28A). Malgrat que el nivells de Survivina ectòpica són elevats, aquesta no protegeix a la cèl·lula de la inducció de proteïnes relacionades amb parada de cicle cel·lular i apoptosi com p53, p21, MDM2, Puma i caspasa 3 cleaved (Figura 28A)

A més, l'expressió de Survivina ectòpica no va disminuir la inducció d'apoptosi després del tractament amb Nutlina-3a (6,8% en el pcDNA buit vs 8.55% del pcDNA transfectat amb Survivina en les cèl·lules control tractades amb DMSO; 21, 2% en pcDNA buit vs 24.6% en el pcDNA transfectat amb Survivina en cèl·lules tractades amb Nutlina-3a). (Figura 28B)

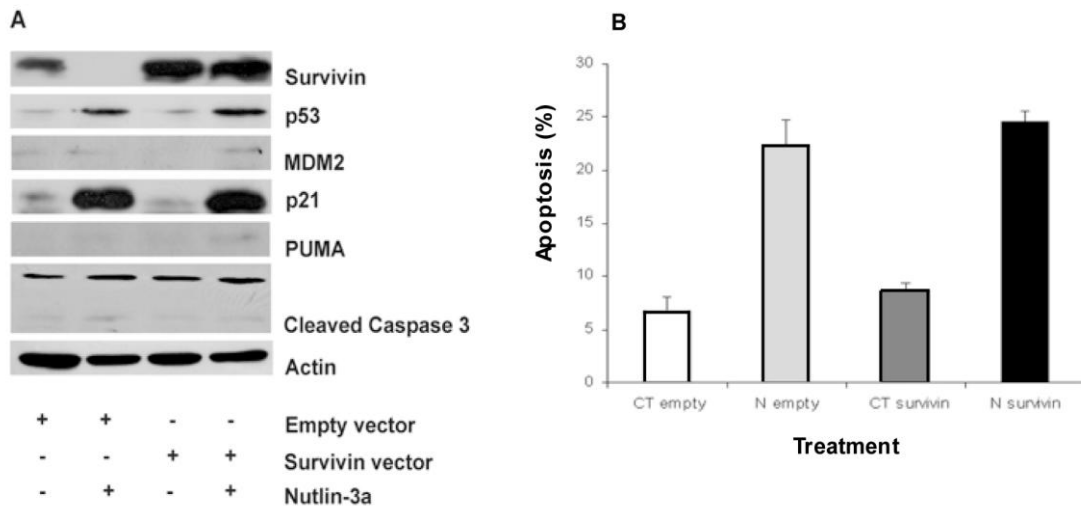
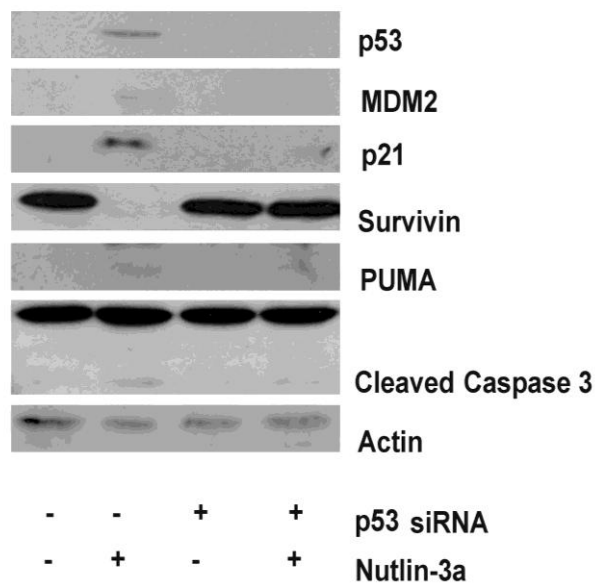


Figura 28. Transfecció i expressió ectòpica de la Survivina. A) Western blot es va realitzar 48 hores després de la transfecció i 72 hores després de del tractament (DMSO o Nutlina-3a). B) Anàlisi de la inducció d'apoptosi mesurant el marcatge de cèl·lules Annexina V positives per citometria de flux. (empty: vector buit; Survivin: vector d'expressió de Survivina).

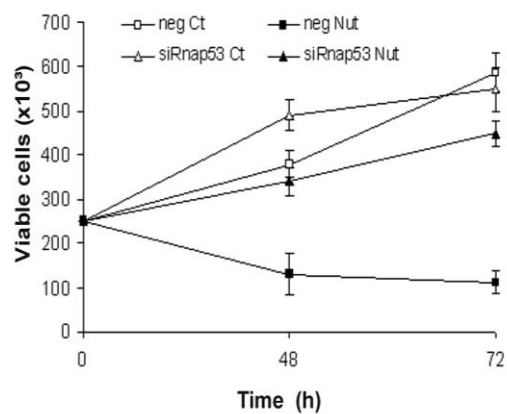
La eficàcia de la Nutlina-3a resideix en que la cèl·lula tractada disposi de la proteïna i de la via de p53 intacta. Per comprovar si la línia cel·lular U87-MG podria esdevenir resistent a la inducció d'apoptosi, així com també a la parada de cicle cel·lular, es va transfectar amb un siRNA de p53 (o amb siRNA control) i 48 hores després va ser tractada amb una dosi de 10µM de Nutlina-3a durant 24, 48 i 72 hores.

El Western blot portat a terme va demostrar que després de 72 hores de tractament amb Nutlina-3a en les cèl·lules transfectades amb el siRNA control, hi va haver inducció de p53, p21, MDM2 i lleugeres induccions de PUMA i la caspasa 3 cleaved. Mentre que, per altra banda, després de la transfecció amb el siRNA de p53 l'expressió d'aquestes proteïnes va disminuir fins assolir nivells basals. Al contrari, l'expressió de Survivina es manté elevada amb el siRNA de p53 i el tractament amb l'antagonista de MDM2 (Figura 29A). A més, la viabilitat cel·lular és va mantenir després de la transfecció i el posterior tractament amb Nutlina-3a (Figura 29B), així com també es va produir una disminució en la inducció d'apoptosi en comparació amb el siRNA control (Figura 29C).

A



B



C

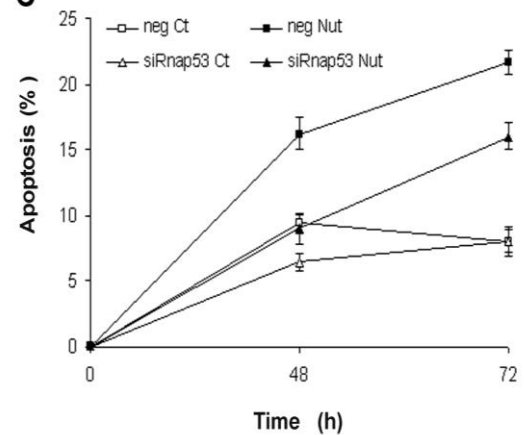


Figura 29. Silenciament de p53 en la línia cel·lular U87-MG. A) Western blot realitzat 48 hores després de la transfecció i 72 hores després del tractament (Nutlina-3a o DMSO). B) Recompte cel·lular després de la transfecció (48 hores) i de la incubació amb Nutlina-3a (48 i 72 hores). C) Anàlisi de la inducció d'apoptosi mesurant el marcatge de cèl·lules Annexina V positives per citometria de flux.

2.5 Radiosensibilització de cèl·lules de glioma amb p53 normal amb l'exposició a la Nutlina-3a

Estudis previs realitzats en línies cel·lulars de càncer de pulmó i càncer de pròstata, tumors amb un alt grau de resistència a la radioteràpia, havien descrit que el tractament amb Nutlina-3a sensibilitzava aquests tumors enfront a la radiació (Cao C, 2006; Supiot S, 2008). Els gliomes, al igual que els tumors esmentats anteriorment, són resistents al tractament amb radioteràpia. Estudis previs demostren que les cèl·lules tumorals són més radiosensitives en fase G1 que en la fase S del cicle cel·lular (Pawlik TM, 2004). Al haver observat que Nutlina-3a induïa una parada de cicle en la fase G1 en la línia de glioma U87-MG, ens vàrem qüestionar si el pretractament amb Nutlina-3a podria radiosensibilitzar aquestes cèl·lules. Per tal d'avaluar la capacitat de Nutlina-3a de sensibilitzar les cèl·lules de glioblastoma a la radioteràpia es va portar a terme un assaig de formació de colònies en la línia cel·lular U87-MG. Les cèl·lules varen ser tractades durant 2 hores amb Nutlina-3a (0.5µM) o DMSO (control) i després varen ser irradiades a diferents dosis (0, 2, 4, 6 o 8 Gy). L'anàlisi de la fracció de supervivència va demostrar que tractament amb Nutlina-3a va radiosensibilitzar la línia de glioma U87-MG (comparació de valors de la fracció de supervivència control vs Nutlina-3a $p < 0.0001$) tal i com es mostra a la figura 30A.

També es va analitzar si Nutlina-3a podia sensibilitzar les cèl·lules de glioma a quimioteràpics freqüentment utilitzats en el tractament del GBM, com el cisplatí o la temozolomida. El cisplatí és un agent alquilant que actua formant unions creuades intracatenàries i intercatenàries al DNA. La temozolomida és un agent metilant que transfereix un grup metil a la cadena de DNA (veure apartat 2.3. d'Introducció). Així, la incubació de les cèl·lules U87-MG amb Nutlina-3a (0.5 µM) amb combinació amb cisplatí (2µM) va disminuir de forma significativa la viabilitat cel·lular en relació a cada tractament individual (t de Student, $p < 0.05$) amb un índex de combinació de 0.16, (Biosoft CalcuSyn program (Ferguson, MO) el que suggereix un efecte sinèrgic. Pel contrari, el tractament combinat de Nutlina-3a i temozolomida no va produir cap disminució significativa en la viabilitat cel·lular (Figura 30B).

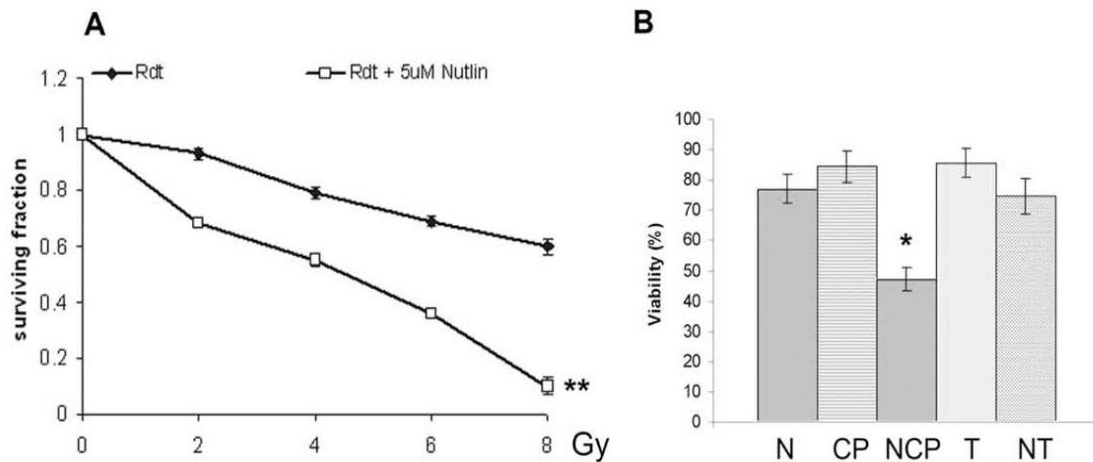


Figura 30. La Nutlina-3a potencia l'efecte de la radioteràpia sobre cèl·lules de glioma amb p53 normal. A) Assaig de formació de colònies. Gràfica de la fracció de supervivència cel·lular en les U87-MG després de 2 hores de pretractament amb DMSO (vehicle control) (◊) or 0.5μM de Nutlina-3a (◻), seguit d'una exposició a radiació ionitzant (0,2,4,6 i 8 Gy). La gràfica es la mitjana de 3 experiments independents. B) Assaig MTT per la mesura de la viabilitat cel·lular en U87-MG després de ser tractades amb 0,5μM de Nutlina-3a (N), 2μM de Cisplatí (CP), tots dos (NCP); o ser tractat amb 1μM de temozolamida (T), o totes dues (NT). La gràfica es la mitjana de 3 experiments independents. Significació estadística *p<0.05, **p<0.0001 (t de Student)

2.6 Efecte de la Nutlina-3a en el tractament de cultius primaris de glioblastoma. Inducció de parada en el cicle cel·lular, apoptosi i senescència

Per tal d'analitzar l'efecte de la incubació amb Nutlina-3a en cultius primaris de GBM, es varen tractar 9 cultius primaris establerts en el laboratori (veure resultats objectiu 1). En la taula següent es mostren les característiques histològiques i genètiques dels pacients.

| Pacient | Edat | Diagnòstic | Grau W.H.O. | Estat de p53 | Estat metilació promotor MGMT | Mutació en EGFRvIII |
|---------|------|------------|-------------|--------------|-------------------------------|---------------------|
| 02/0205 | 65 | GBM | IV | Wt | No metilat | + |
| 03/0305 | 74 | GBM | IV | Wt | Metilat | Nd |
| 14/1405 | 49 | GBM | IV | Wt | No metilat | Nd |
| 17/1705 | 65 | GBM | IV | Wt | Nd | Nd |
| 19/1905 | 77 | GBM | IV | Wt | Metilat | Nd |
| 20/2005 | 76 | GBM | IV | Wt | No metilat | - |
| 23/0306 | 72 | GBM | IV | Mutat | Nd | - |
| 33/1306 | 69 | GBM | IV | Wt | No metilat | - |
| 35/1506 | 45 | GBM | IV | P | Metilat | + |

Taula 1. Característiques del pacients. GBM: glioblastoma multiforme; Wt: wild type, p53 normal; P: polimorfisme R72P; Nd: No realitzat.

Els cultius primaris de 9 pacients varen ser tractats amb 10µM de Nutlina-3a durant 48 i 96 hores. Inicialment, al observar els cultius primaris al microscopi òptic durant el temps de tractament amb Nutlina-3a, es va apreciar una clara disminució en el nombre de cèl·lules tractades en comparació al controls (DMSO) (Figura 31, mostres 03/0305 i 33/1306). No obstant, en alguns casos no s'apreciava visualment la disminució en el nombre de cèl·lules després de ser exposades a la Nutlina-3a (Figura 31, mostra 35/1506).

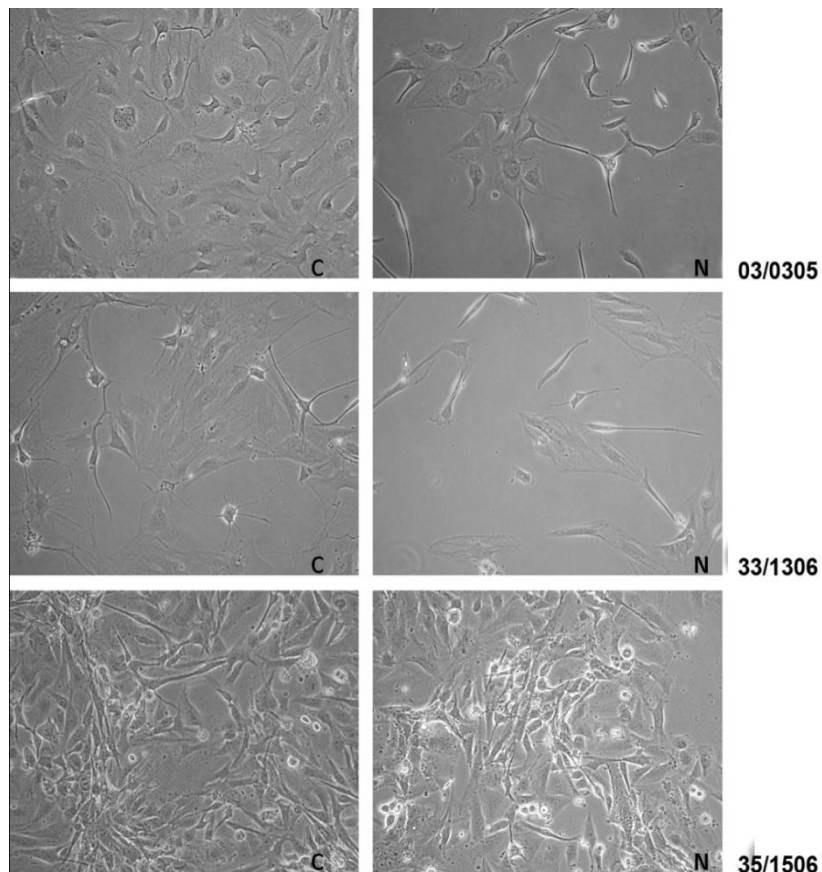


Figura 31. Imatge de cultius primaris tractats amb Nutlina-3a durant 96 hores i visualitzats al microscopi òptic 20x. (C: control; N: Nutlina-3a).

Tal i com les imatges suggerien, el recompte cel·lular va demostrar la presència d'una disminució estadísticament significativa (t de Student $p=0.005$) en el nombre de cèl·lules en 9 cultius primaris després de la incubació de 96 hores amb Nutlina-3a. En dos casos (cultius 23/0306 i 35/1506) no es va observar disminució en el nombre de cèl·lules respecte al control (DMSO) (Figura 32A)

Per aprofundir en l'efecte que la Nutlina-3a provocava en els cultius primaris de glioblastoma, es va analitzar la inducció d'apoptosi amb Anexina V per citometria de flux (es va realitzar en tots els cultius menys en el 17/1705 degut a la presència d'un nombre insuficient de cèl·lules). La incubació durant 96 hores amb Nutlina-3a provocà una disminució en la viabilitat cel·lular del $91\% \pm 2\%$ en el grup control fins $78\% \pm 10\%$ en el grup tractat amb l'antagonista MDM2 (t de Student $p=0.012$) en aquells cultius primaris amb p53 wt. A més, el tractament amb Nutlina-3a va induir apoptosi en els cultius primaris de glioblastoma amb p53 wt, però amb una resposta heterogènia entre els diferents cultius. Per altra part, els cultius

primaris 23/0305 i 35/1506 no van respondre amb inducció d'apoptosi després del tractament amb Nutlina-3a (Figura 32B).

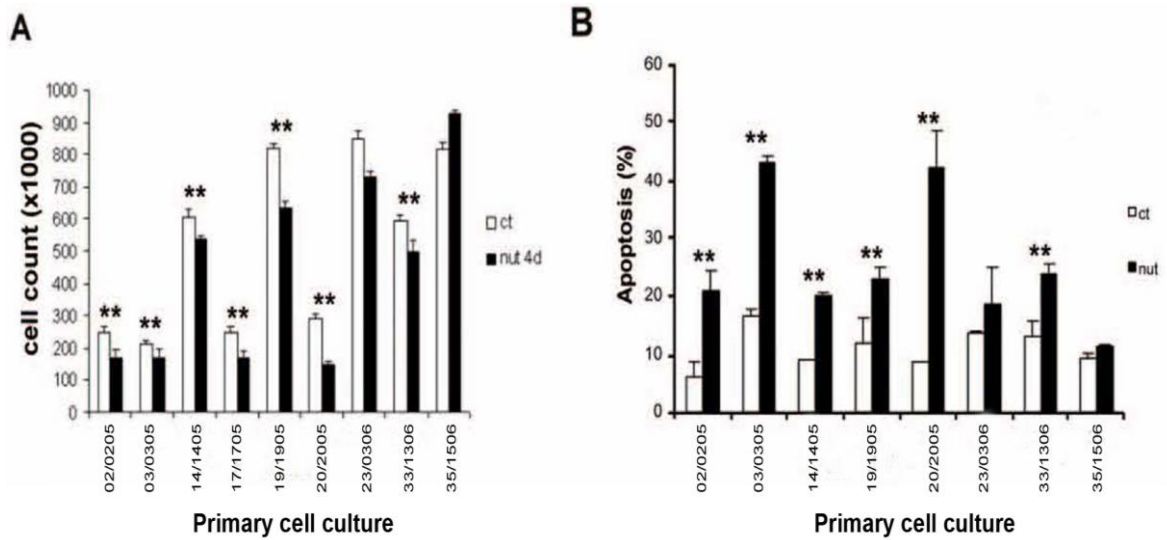


Figura 32. Efecte del antagonista de MDM2 Nutlina-3a en cultius primaris de glioblastoma. A) Recompte cel·lular de 9 cultius primaris de glioblastoma tractats amb DMSO (vehicle control) (□) o amb una dosi de 10µM de Nutlina-3a (■). Mitjana de dos experiments independents. **p<0.01 (t de Student). B) Efecte de la Nutlina-3a en la inducció de l'apoptosi en 8 cultius primaris glioblastoma tractats amb DMSO (vehicle control) (□) o amb una dosi de 10µM de Nutlina-3a (■). Mitjana de dos experiments independents. **p<0.01 el tractament amb Nutlina-3a és estadísticament significatiu respecte als controls no tractats (t de Student).

Després d'estudiar la resposta cel·lular dels cultius primaris davant el tractament amb Nutlina-3a i comprovar que hi havia cultius que no responien, vàrem sospitar que aquests cultius podien tenir mutacions en el gen de *TP53*. La seqüenciació dels exons dels 5 al 8 del gen *TP53* va mostrar la presència d'una mutació en els cultius 23/0306 resistent a Nutlina-3a, mentre que la resta de cultius tenien un p53 wt. En aquest sentit, el cultiu 23/0306 va mostrar una mutació de l'exó 8 en el codó 306 (R306X) que provocava un STOP prematur en la proteïna (Figura 33).

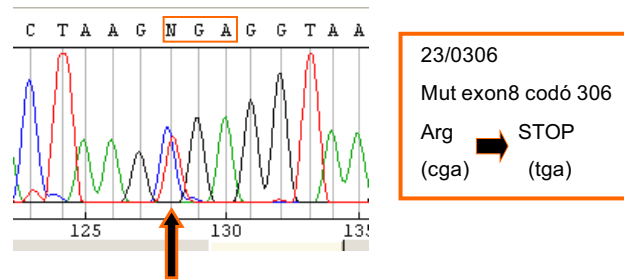


Figura 33. Seqüenciació de p53 en el cultiu primari 23/0306. El cultiu primari va ser seqüenciat a partir de la descongelació (-80°C) i extracció de DNA d'una mostra del teixit tumoral del pacient.

Mentre que inicialment no es va trobar cap mutació situada entre els exons 5 al 8 en el cultiu 35/1506, al seqüenciar tot el gen complet vàrem trobar que era portador d'un polimorfisme a l'exó 4 en el codó 72 que dona lloc a un canvi d'aminoàcid (R72P). Aquest polimorfisme va ser descrit prèviament en cèl·lules de càncer de pulmó on es descrivia que aquesta proteïna posseïa un menor potencial a l'hora de induir apoptosi (Whibley C, 2009; Sullivan A, 2004).

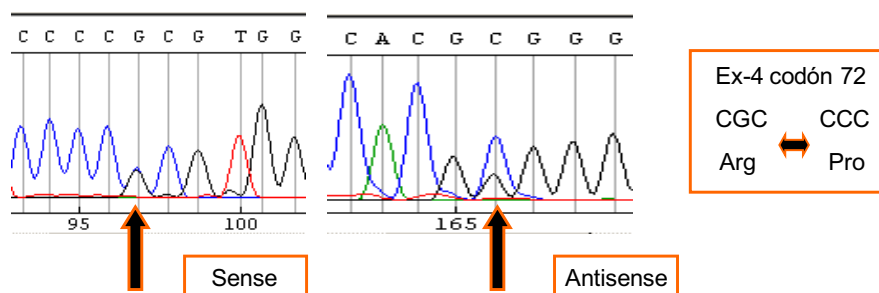


Figura 34. Seqüenciació de p53 en el cultiu primari 35/1506. El cultiu primari va ser seqüenciat a partir de la descongelació (-80°C) i extracció de DNA d'una mostra del teixit tumoral del pacient.

Els anteriors experiments varen confirmar la hipòtesi de que la inhibició de la interacció MDM2-p53 en cultius cel·lulars amb la via i un p53 funcional indueixen la mort cel·lular per apoptosi, mentre que els cultius cel·lulars amb una via alterada esdevenen resistents a aquest tractament.

Per estudiar la inducció d'apoptosi dependent de p53 en cultius primaris de glioblastoma i avaluar els canvis produïts en els diferents gens relacionats en el procés d'apoptosi es va portar a terme un RT-MLPA en 6 mostres tumorals. Tres mostres van quedar excloses de l'anàlisi com a conseqüència de la mala qualitat del RNA. La Nutlina-3a després de

48 hores de incubació va induir canvis en l'expressió gènica dels gens PUMA, Noxa i Survivina en les mostres amb p53 wt.

Un dels canvis més sorprenents va ser la disminució en l'expressió del mRNA de Survivina en aquells cultius primaris on prèviament s'havia observat un menor nombre de cèl·lules i inducció d'apoptosi (14/1405, 17/1705, 19/1905 i 33/1306). A més, en tots els cultius primaris que responien al tractament menys el 17/1705 es va observar també un increment en l'expressió del mRNA de PUMA. Finalment les mostres 14/1405 i 17/1705 mostraven un augment de mRNA de Noxa. Per altra banda, els cultius que prèviament no mostraven resposta al tractament amb Nutlina-3a (23/0306 i 35/1506), no presentaven induccions en l'expressió del mRNA de PUMA i Noxa ni disminució de Survivina (Figura 35).

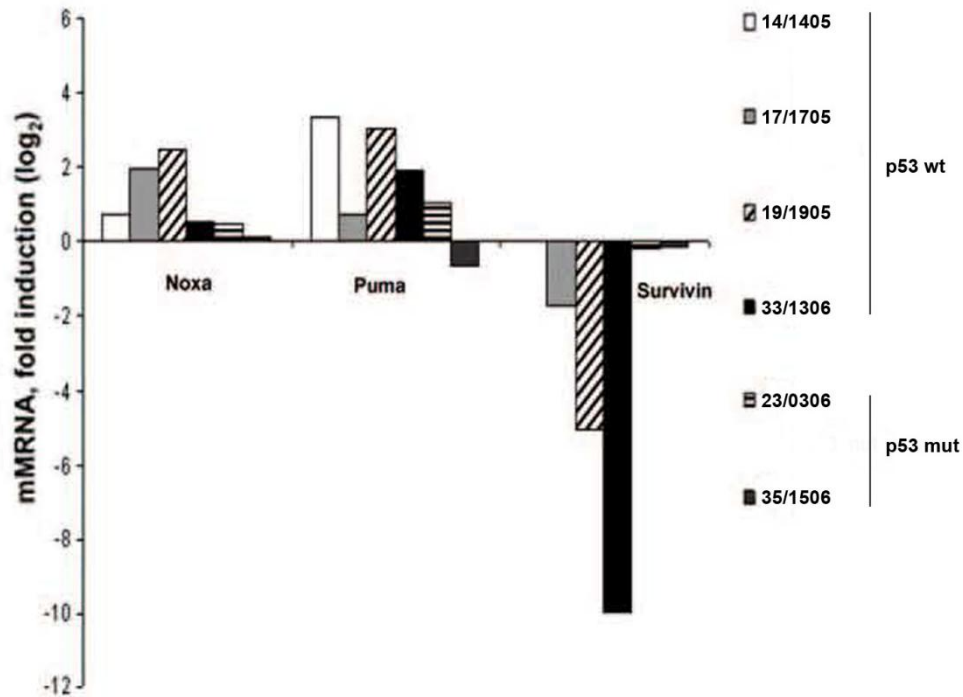


Figura 35. Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA de gens implicats en l'apoptosi mitjançant RT-MLPA. Quantificació del mRNA expressada en logaritme en base 2 de la increment relatiu en relació als controls (tractats amb DMSO).

A partir dels resultats obtinguts en el RT-MLPA, vam voler confirmar que els canvis que es varen observar en l'expressió del mRNA es corresponien amb canvis en els nivells d'expressió proteics. Es va analitzar l'expressió de p53, MDM2, p21, PUMA, Noxa i Survivina mitjançant Western blot després de la incubació amb Nutlina-3a durant 96 hores (Figura 36).

En aquells cultius primaris amb un p53 wt es va observar un increment de les proteïnes p53 i p21 després del tractament. La proteïna MDM2, diana directe de p53, també augmentà la seva expressió en 3 dels 6 cultius primaris que van respondre a la Nutlina-3a (03/0305, 17/1705 i 20/2005), el quals presentaven una major inducció d'apoptosi.

Els nivells proteics de Survivina van disminuir en els cultius primaris on s'induïa el mecanisme d'apoptosi, corroborant els resultats que es varen obtenir amb el RT-MLPA.

Els nivells d'expressió de la proteïna anti-apoptòtica Noxa van augmentar en 5 dels 6 cultius primaris amb p53 wt (03/0305, 14/1405, 19/1905, 20/2005 i 33/1306), en concordança amb els resultats del RT-MLPA. A més, PUMA es va acumular després de la inhibició de MDM2 en 4 dels 6 pacients amb una proteïna p53 wt (14/1405, 19/1905, 20/2005 i 33/1306).

En els cas del cultius primaris resistents al tractament amb Nutlina-3a (23/0306 i 35/1506), no es varen observar canvis en els nivells d'expressió proteica de Survivina, PUMA o Noxa. Els nivells basals d'expressió de p53 eren elevats sense evidència d'inducció significativa després de la inhibició de MDM2.

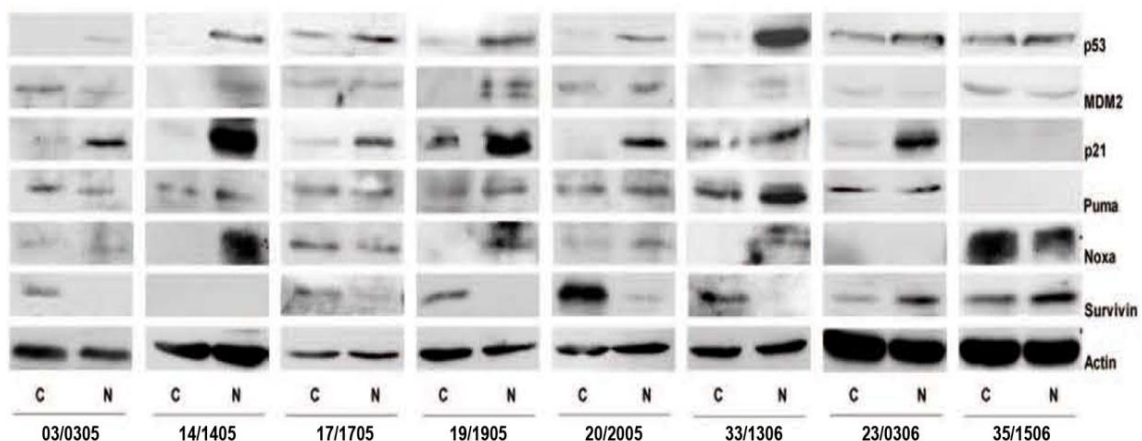


Figura 36. Anàlisi de l'expressió proteica mitjançant Western blot. Les proteïnes vas ser avaluades 96 hores després de l'exposició amb Nutlina-3a. Les cèl·lules dels cultius primaris tractats amb DMSO o Nutlina-3a van ser trencades per extreure el pool de proteïna per ser estudiada per Western blot. CT: Control; N: Nutlina-3a.

Finalment, per estudiar si el tractament amb Nutlina-3a induïa senescència en els cultius primaris amb un p53 normal, tal i com es va observar en la línia cel·lular U87-MG, es van tractar els cultius primaris amb 10µM de Nutlina-3a i es va avaluar l'expressió del marcador de senescència SA-βGAL als 4 dies de tractament. Després de la incubació amb Nutlina-3a el nombre de cèl·lules positives per el marcador de senescència en comparació al

control va augmentar dels $28\% \pm 9\%$ fins al $82\% \pm 8\%$ respectivament (t de Student, $p < 0.001$) (figura 37).

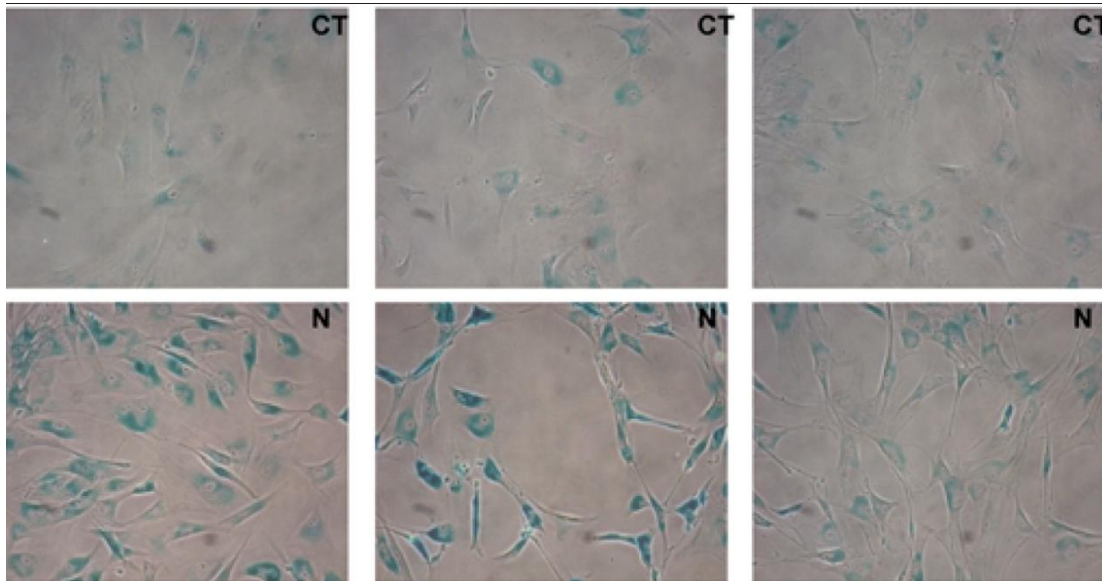


Figura 37. Anàlisi de la senescència cel·lular. Fotografies realitzades amb el microscopi òptic a cultius primaris marcats amb SA-βGal després del tractament amb DMSO (controls) o amb 10μM de Nutlina-3a amb una incubació de 4 dies (C: Control; N: Nutlina-3a).

En relació a la nul·la resposta al tractament amb Nutlin-3a observada en el cultiu primari 35/1506 i l'estat de p53 en cultiu (presència del polimorfisme R72P però absència d'una mutació puntual) vàrem voler avaluar si l'absència de resposta als inhibidors de MDM2 podia estar relacionada amb algun altre mecanisme a més del polimorfisme R72P. Per això, vàrem analitzar la presència d'amplificació i/o la mutació EGFRvIII del receptor de EGF. Una de les alteracions genètiques més freqüents en glioblastomes humans, és l'activació del receptor EGF, per amplificació gènica o activació mutacional (Furnari FB, 2007). Els resultats es varen demostrar que el cultiu primari 35/1506 era portador d'una amplificació del gen salvatge juntament amb la forma mutada EGFRvIII. Per tal de comprovar que no es tractava d'artefacte de cultiu, varem també analitzar la presència d'aquestes alteracions genètiques en el tumor en fresc i vàrem obtenir el mateixos resultats. Amb aquesta mutació el receptor EGFR es troba constitutivament activat en absència de lligant (Figura 38A). Es varen analitzar els nivells proteics de p-AKT (Ser 473) i p-ERK1/2 basals i després del tractament amb Nutlina a les 24 hores. El cultiu primari 35/1506 mostrava nivells basals elevats de les dues proteïnes analitzades i el tractament amb Nutlina-3a incrementaven els nivells de p-AKT i p-ERK1/2

indicatiu de l'activació constitutiva de la via *EGFR/RAS/NF1/PTEN/AKT/mTOR* i la sobreactivació d'aquesta via per efecte de Nutlina-3a (Figura 38B).

Per avaluar el rol de l'activació de la via *EGFR/RAS/NF1/PTEN/AKT/mTOR* en el fracàs per induir apoptosi dependent de p53 després del tractament amb Nutlina-3a, les cèl·lules de el cultiu primari 35/1506 varen ser exposades a diferents inhibidors de la via (Akr-1-1/2, inhibidor d'AKT (5µM), AG1478, inhibidor de EGFR (5µM) i Ly294002, inhibidor PI3K (5µM)) en presència o absència de Nutlina-3a (10µM) durant 96 hores.

Cada inhibidor per si sol era capaç de reduir el recompte cel·lular al comparar amb el control a les 96 d'exposició, però cap d'ells té un efecte sinèrgic amb la Nutina-3a, el que indica que tot l'efecte observat era dependent de l'inhibidor. L'anàlisi de les proteïnes demostrà que no hi havia canvis en els nivells d'expressió de p53 o ni de Survivina després de la inhibició d'AKT o de PI3K. Per altra banda, el tractament amb el inhibidor de EGFR AG1478, sol o en combinació amb Nutlina-3a, sí que va disminuir significativament els nivells proteics de p53 i Survivina (Figura 38C). Aquests resultats suggereixen que en el cultiu primari 35/1506 amb activació d'EGFR per dos mecanismes (amplificació del gen salvatge i la mutació EGFRvIII), la proliferació cel·lular es dependent sobretot de la via *EGFR/RAF/MEK/ERK*, i la seva activació constitutiva li confereix una major supervivència cel·lular i una menor apoptosi dependent de p53.

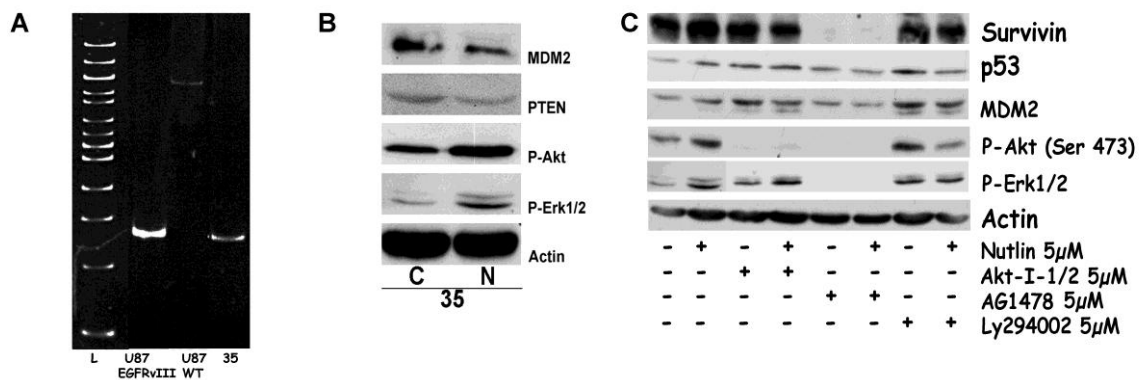


Figura 38. Anàlisi de la via d'EGFR en el cultiu primari 35/1506. A) Anàlisi del estat de EGFR per RT-PCR. B) Determinació de l'activació dels gens de la via EGFR. C: Control no tractat (DMSO) N: 10µM de Nutlina-3a) Anàlisi de l'expressió proteica en el tractament amb inhibidors de la via de EGFR i la combinació amb Nutlina-3a.

2.7 Determinació de la inducció d'apoptosi i anàlisi de l'expressió proteica en astròcits humans normals després del tractament amb Nutlina-3a

La resposta cel·lular al tractament amb Nutlina-3a en cèl·lules tumorals de glioblastoma amb un p53 wt ha demostrat la inducció d'apoptosi i senescència, però en cèl·lules normals de cervell no es coneixien quines podien ser les conseqüències del tractament. Per respondre aquest dubte es va avaluar l'efecte de la Nutlina-3a sobre cèl·lules normals de cervell humà. Es varen incubar astròcits humans normals (NHA; Normal Human Astrocytes) amb Nutlina-3a a una concentració final de 10µM, i es va analitzar els canvis en la viabilitat cel·lular a través d'un assaig de MTT. Els NHA tractats amb Nutlina -3a presentaven una disminució de la viabilitat en l'assaig per MTT (100% de viabilitat en els controls i 40% de viabilitat després de 96 hores d'exposició amb Nutlina-3a). Per estudiar si la disminució en la viabilitat observada en el MTT podria ser secundària a mort cel·lular es va analitzar la inducció d'apoptosi mitjançant citometria de flux després del tractament amb 10µM de Nutlina-3a durant 24, 48, 72 i 96 hores. Els resultats varen demostrar que Nutlina-3a no induïa apoptosi en els NHA (Figura 39 A).

L'anàlisi de l'expressió proteica realitzada per Western blot va mostrar increments en els nivells de p53, MDM2 i p21 (Figura 39B). La discrepància observada quan es compara la disminució en el nombre de cèl·lules estudiada per MTT amb l'absència d'inducció d'apoptosi i l'augment en els nivells d'expressió de la proteïna p21 suggereixen que Nutlina-3a indueix parada de cicle cel·lular però no apoptosi en astròcits normals.

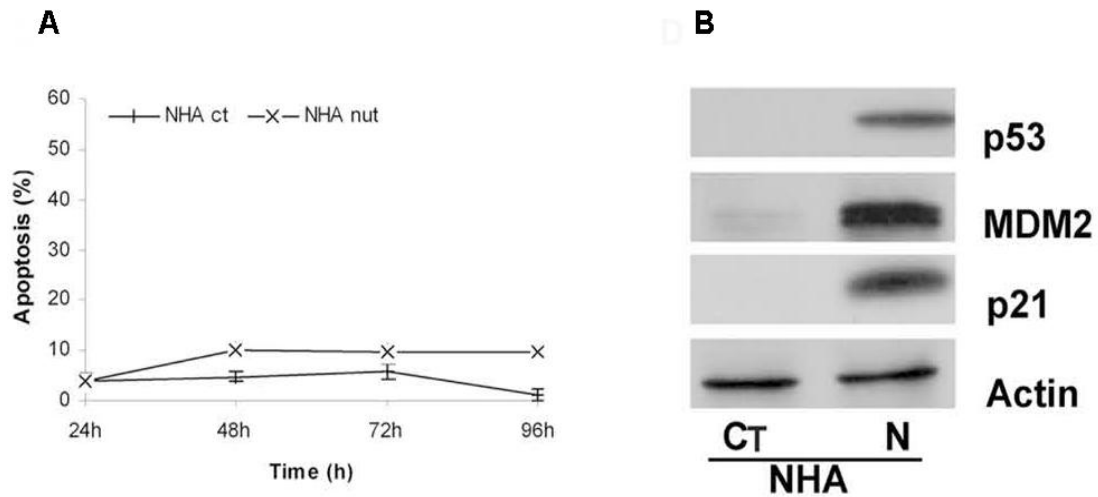


Figura 39. Efecte del tractament amb Nutlina-3a en NHA. A) Time course de inducció d'apoptosi, mesurat a partir del marcador d'apoptosi Anexina V (NHA ct: Control DMSO; NHA nut: Nutlina-3a). Els resultats mostrats són la mitjana de 3 experiments independents. B) Anàlisi de l'expressió proteica mitjançant Western blot. Efecte en p53, MDM2, p21 després de la incubació de NHA amb Nutlina-3a (CT: Control tractat amb DMSO; N: 10 μ M de Nutlina-3a).

Objectiu 3. Tractament de línies cel·lulars de glioma i del cultiu primari 35/1506 amb YM155, un inhibidor de Survivina

3.1 Introducció

La Survivina és el membre més petit de la família de proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAPs). Originàriament va ser descrita com un inhibidor de caspases que ajudava a mantenir la supervivència cel·lular. Actualment es coneix que posseeix un ampli ventall funcional, participant en processos tan diversos com la divisió cel·lular, metabolisme i adaptació a nous ambients, entre altres (Altieri DC, 2008).

L'expressió de Survivina en teixits normals d'adults queda reduïda a una mínima participació en diversos processos fisiològics, mentre que en teixits fetals i embrionaris els nivells d'expressió de la Survivina són molt elevats, així com també en la majoria de càncers humans (Yamamoto H,2008). En cèl·lules tumorals l'expressió de Survivina induïx canvis transcripcionals en l'ambient tumoral que promouen la proliferació cel·lular i la progressió tumoral (Yamamoto H,2008). Evidències clíniques indiquen que la sobreexpressió de Survivina confereix una avantatge pel que fa a la supervivència de les cèl·lules tumorals, ja que s'associa amb resistència als tractaments antitumorals. Per tant, una inhibició d'aquesta proteïna podria induir mort cel·lular i/o sensibilitzar aquests tumors enfront altres tractaments.

YM155 és un compost basat en el imidazolium que va ser identificat per una recerca mitjançant un cribatge d'alt rendiment a partir de llibreries d'inhibidors de l'activitat del promotor del gen de la Survivina (Nakahara T, 2007). La inhibició de la Survivina per aquest compost té efectes mínims en els nivells d'expressió d'altres membres de les IAPs o proteïnes relacionades amb Bcl-2 (Nakahara T, 2011).

3.2 Efecte del YM155 en el tractament de línies cel·lulars de glioma

El primer pas per avaluar quins canvis produïa la exposició de YM155 en les línies cel·lulars de glioblastoma va ser realitzar un estudi dosi-resposta (dosis entre 2,5 i 400 nM) i *time-course* (de 24 a 72 hores) mitjançant un assaig de viabilitat de MTT. Les línies cel·lulars utilitzades van ser:

1. U87-MG i U87-EGFRvIII, les dues amb una proteïna p53 wt, però amb la diferència que les segones estan transfectades establement amb un vector que expressa la variant EGFRvIII. Aquesta mutació del receptor EGFR consisteix en una deleció dels exons 2-8 i es troba constitutivament activa. Estudis previs han demostrat que EGFRvIII participa en els mecanismes de resistència als tractaments, entre el qual s'inclou la radioteràpia.
2. T98G i les ANGM-CSS, les primeres amb una proteïna p53 mutada i les segones amb una deleció en el cromosoma 17 on es troba el gen TP53.

El tractament amb YM155 va ocasionar una disminució en la viabilitat cel·lular que comença a ser visible a les 24 hores d'exposició, però que és molt més evident a les 48 hores d'incubació. YM155 va induir una disminució en la viabilitat cel·lular temps i dosis depenent en totes les línies cel·lulars menys en les T98G (Figura 40B). En aquesta línia, l'augment de la dosi fins a 1000nM si que ens va permetre observar disminució en la viabilitat cel·lular. En totes les línies el millor temps d'anàlisi va ser 48 hores, ja que a les 72 hores s'observaven moltes cèl·lules necròtiques. La concentració inhibidora 50 (IC₅₀) a les 48h que va ser de: U87-MG 7,5nM, U87EGFRvIII 25nM, ANGM-CSS 7,5nM i T98G 200nM. La línia cel·lular U87-EGFRvIII mostra disminució en la viabilitat cel·lular a tots els temps avaluats a una dosi de tractament superior que la línia U87-MG que no expressen EGFRvIII.

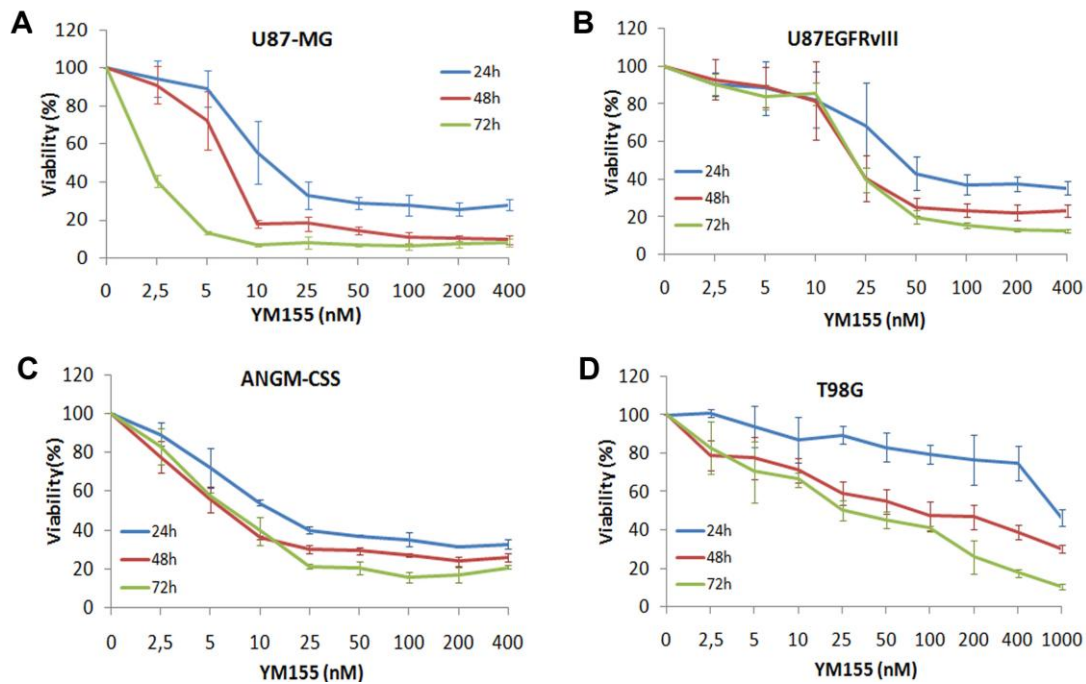


Figura 40. Anàlisi de la viabilitat cel·lular per assaig de MTT en les línies cel·lulars de glioma tractades a dosis creixents de YM155 amb un període de tractament de 24, 48 i 72. La gràfica es la mitjana de 3 experiments independents.

3.3 YM155 indueix una Inhibició de l'expressió de Survivina

El tractament amb YM155 provoca una disminució en l'expressió de Survivina a través de la inhibició del seu promotor. Per confirmar que l'efecte del YM155 ocasionava una disminució en els nivells de survivina en les cèl·lules de glioma, es van exposar les línies cel·lulars de glioma a dosis creixents de YM155 durant 48 hores i es van analitzar els nivells proteics de Survivina per Western blot (Figura 41)

El tractament de les línies cel·lulars amb YM155 de 1 a 1000nM durant 48 hores inhibeix l'expressió de la Survivina de forma depenent de la concentració i en funció de la sensibilitat de cada línia cel·lular a la molècula. En aquest sentit, en la línia U87 s'observa una disminució de Survivina a partir d'una dosi de 25nM. En les cèl·lules U87vIII la disminució de Survivina s'observa a partir de 50nM. La línia cel·lular ANGM disminueix el nivells de Survivina a partir de una dosi de 10nM. Finalment, T98G no disminueix el nivells de Survivina fins arribar a una dosi de 500nM.

A més, el tractament amb YM155 indueix l'expressió de p53 en aquelles línies p53 wt. Cal destacar que en les línies U87MG i ANGM l'augment de la dosi de YM155 per sobre dels nivells en els quals inhibeix l'expressió de Survivina en cada línia cel·lular, va ocasionar una disminució de la inducció de p53 i un augment de Survivina. Aquest fet suggereix que, en dosi massa elevades de YM155 l'efecte observat podria ser inespecífic, més enllà de la inhibició del promotor de Survivina.

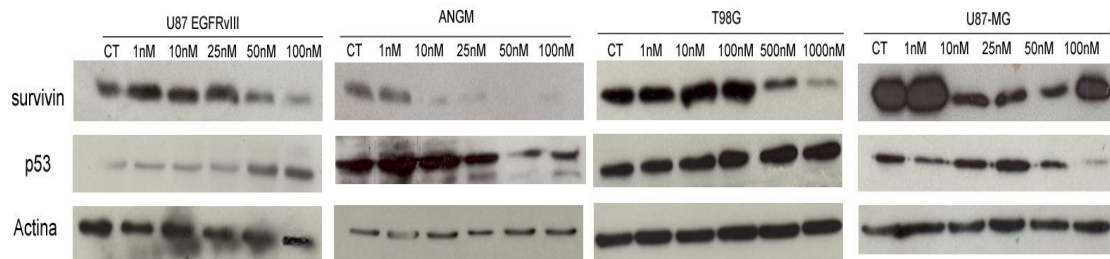


Figura 42. Anàlisi de l'expressió proteica de la Survivina a diferents dosis i 48 hores en línies cel·lulars de glioblastoma tractades amb YM155.

3.4 YM155 indueix canvis morfològics en les línies cel·lulars de glioma

Per avaluar si el tractament amb YM155 ocasionava canvis en la morfologia cel·lular, es varen tractar les línies cel·lulars de glioma amb dosis creixents de YM155 (de 1 fins a 1000nM, depenent de la sensibilitat de la línia) o amb DMSO durant 48 hores i es va observar al microscopi òptic la morfologia cel·lular.

Després del tractament es va evidenciar una disminució en el nombre de cèl·lules respecte al control tractat amb vehicle, així com també un augment del nombre de cèl·lules més arrodonides, amb un increment de vaquolització citoplasmàtica i tendència a desenganxar-se de la placa. Aquest arrodoniment i increment de la vaquolització suggereix inducció de mort cel·lular.

La línia cel·lular ANGM-CSS es va mostrar com la línia més sensible on a 10nM de YM155 el nombre de cèl·lules es menys de la meitat respecte al control, a més d'apreciar-ne un alt nombre de cèl·lules arrodonides, seguida de la línia U87-MG amb canvis evidents a 25nM i de les U87EGFRvIII a 50nM. La disminució en el nombre de cèl·lules i els canvis morfològics que s'originaven van ser dosi-depenent. En la línia cel·lular T98G, els primers canvis que van consistir en una disminució del nombre de cèl·lules es van observar a una dosi

RESULTATS

de 100nM. A partir de 500nM, la disminució cel·lular va ser molt més evident i s'acompanyà d'algunes cèl·lules arrodonides i flotant, molt més evident a la dosi de 1000nM.

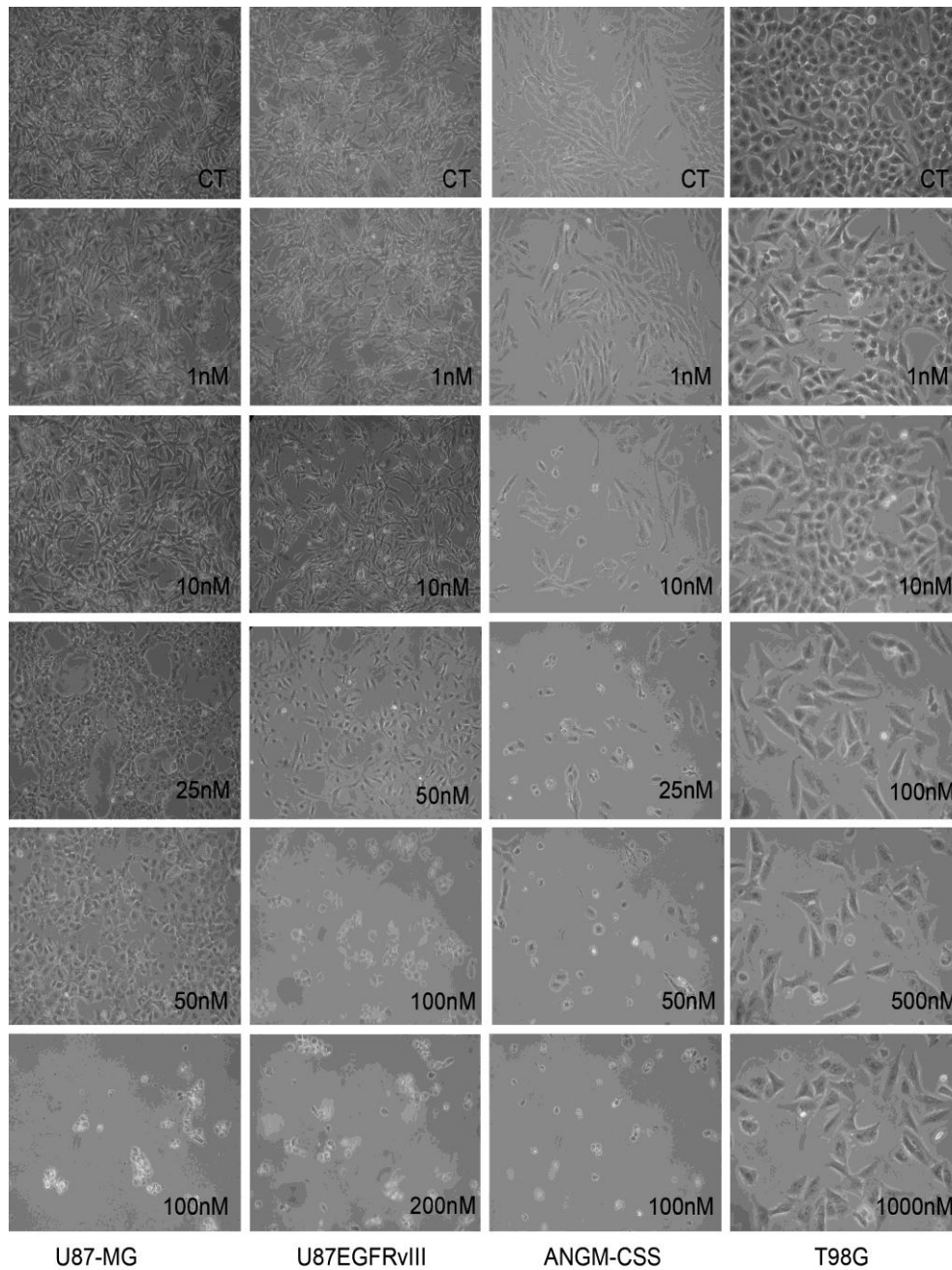


Figura 43. Canvis morfològics en línies cel·lular de glioblastoma després de 48 hores d'exposició amb un dose-course de YM155.

3.5 YM155 indueix apoptosi en les línies cel·lulars de glioma

L'aspecte morfològic de les cèl·lules observades al microscopi òptic durant el tractament amb YM155 suggeria el inici d'un procés de mort cel·lular possiblement tipus apoptòtic. Per estudiar la possible inducció d'apoptosi a les 24 i 48 hores es van utilitzar diferents dosis que incloïen valors inferiors i superiors a la IC_{50} de cada línia obtinguda en el assaig de MTT. Després del tractament es va efectuar un recompte cel·lular per tal d'analitzar la disminució en el nombre de cèl·lules i es va avaluar la inducció d'apoptosi mesurada a partir de l'externalització del marcador Annexina V. El grup control va rebre tractament amb DMSO (vehicle).

En totes les línies cel·lulars es va avaluar el nombre de cèl·lules observades després del tractament a diferents dosis de YM155 tant a les 24 com a les 48 hores de tractament i es va observar una disminució estadísticament significativa en el nombre de cèl·lules de forma dosi i temps depenen en el grup que havien rebut tractament amb YM155 en relació al control tractat amb vehicle (DMSO). La disminució en el nombre de cèl·lules va ser màxima després de 48 hores d'incubació amb l'inhibidor de Survivina (Figura 44).

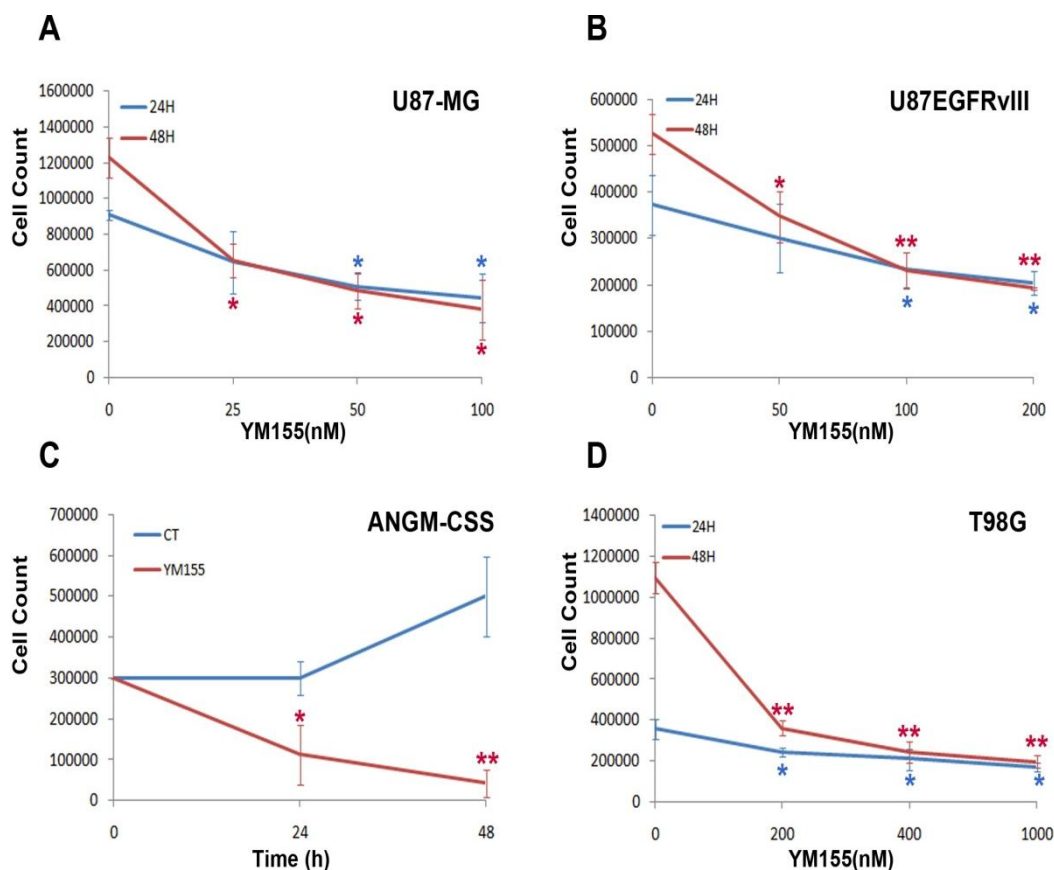


Figura 44. Recompte cel·lular després del tractament amb YM155 en les línies cel·lulars de glioma. Les línies cel·lulars van ser tractades amb dosis creixents de YM155 i contades a 2 temps de tractament (24 i 48 hores). La línia cel·lular ANGM-CSS és va tractar amb una única dosi de 7,5nM. La dosi 0nM indica els controls no tractats (DMSO). Les gràfiques representen la mitjana de 3 experiments independents. * p <0.05; **p<0.005 (test t de Student).

El tractament amb YM155 va induir mort tipus apoptosi i necrosi de forma temps i dosi dependent al comparar-ho amb els controls tractats amb DMSO, sent màxims els valors a les 48 hores d'incubació (Figura 45). En la línia cel·lular U87-MG, YM155 va induir un 20% ± 3% d'apoptosi a la dosi de 25nM. Al augmentar la dosi a 50 i 100nM, l'apoptosi no va augmentar de forma significativa i el que si que es va observar va ser un elevat percentatge de cèl·lules necròtiques (25% i 57%, a 50 i 100nM respectivament). Les cèl·lules U87vIII presentaven un patró de mort similar al anteriorment descrit per la línia U87-MG. A la dosi de 50nM l'apoptosi observada era de 15% ± 2%. Al augmentar la dosi de YM155 fins a 200nM, l'apoptosi no augmentava de forma significativa en relació a la dosi de 50nM i s'observava un elevat percentatge de cèl·lules necròtiques. Les cèl·lules T98G presentaven un patró de comportament diferent, amb inducció de 35% ± 5% i 40% ± 3% d'apoptosi a la dosi de 400nM i 1000nM respectivament, sense una clara inducció de necrosi. La línia cel·lular ANGM-CSS va

mostrar una inducció d'apoptosi del $45\% \pm 5\%$ a les 48 hores de tractament, sense una clara inducció de necrosi.

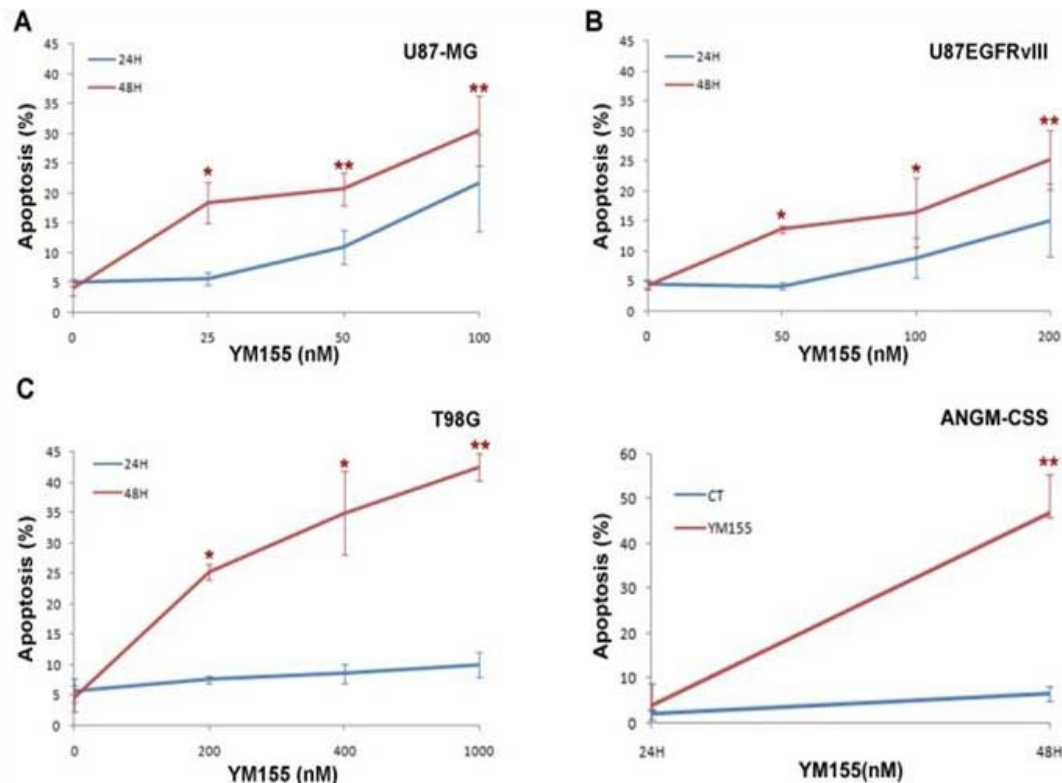


Figura 45 Time- course de inducció d'apoptosi, mesurat a partir de l'externatització de la proteïna de membrana Anexina V. Els valors de la inducció d'apoptosi de les cèl·lules tractades amb diferents dosis de YM155, específiques per a cada línia. La línia cel·lular ANGM-CSS és va tractar amb una única dosi de 7,5nM. Les gràfiques representen la mitjana de 3 experiments independents. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ (test t de Student)

3.6 YM155 indueix canvis en el patró de cicle cel·lular en les línies de glioblastoma

La Survivina participa en la regulació de la divisió cel·lular i la mitosi. La seva expressió durant la fase G2/M es troba controlada transcripcionalment. L'abolició funcional de la Survivina, provoca alteracions en la fase de mitosis que acaben provocant inestabilitat cromosòmica (Johnson ME, 2004; Yamamoto H, 2008).

Durant la realització dels experiments de viabilitat cel·lular i apoptosi, vàrem observar una important diferència entre els valors IC_{50} , la disminució en el nombre de cèl·lules i la inducció d'apoptosi que suggerien que YM155 podria estar induint canvis en el cicle cel·lular. Per avaluar els efectes de YM155 sobre el perfil del cicle cel·lular, les línies de glioma varen ser incubades amb la dosi en la qual havíem vist la major inducció d'apoptosi durant diferents temps (de 0 fins a 36 hores) i es va analitzar les variacions en el patró de cicle cel·lular .

L'anàlisi del perfil del cicle cel·lular mostrà variacions en les fases G0/G1 i S que s'inicià a les 12 hores de tractament i persistia fins a les 30 hores d'incubació amb YM155 (Figura 46). El perfil d'aturada de cicle fou diferent en cada línia avaluada.

La línia T98G mostrava una aturada en la fase G0/G1 a partir de les 12 hores d'incubació fins a les 30 hores de tractament. A partir de llavors, s'observa un augment de la fase S i una disminució de la fase G0/G1. (Figura 46 A i B).

La línia cel·lular U87vIII va mostrar una aturada en la fase S del cicle a partir de les 12 hores de tractament que persistí fins a les 30 hores d'incubació (Figura 46 C i D).

Les cèl·lules U87-MG i ANGM-CSS mostraren un patró més irregular en quan a les variacions en el perfil del cicle cel·lular degut a que són cèl·lules diploides/aneuploides, la qual cosa dificulta més la interpretació dels resultats. És necessari l'estudi del cicle cel·lular amb BrDU per tal de poder avaluar correctament els canvis induïts per YM155.

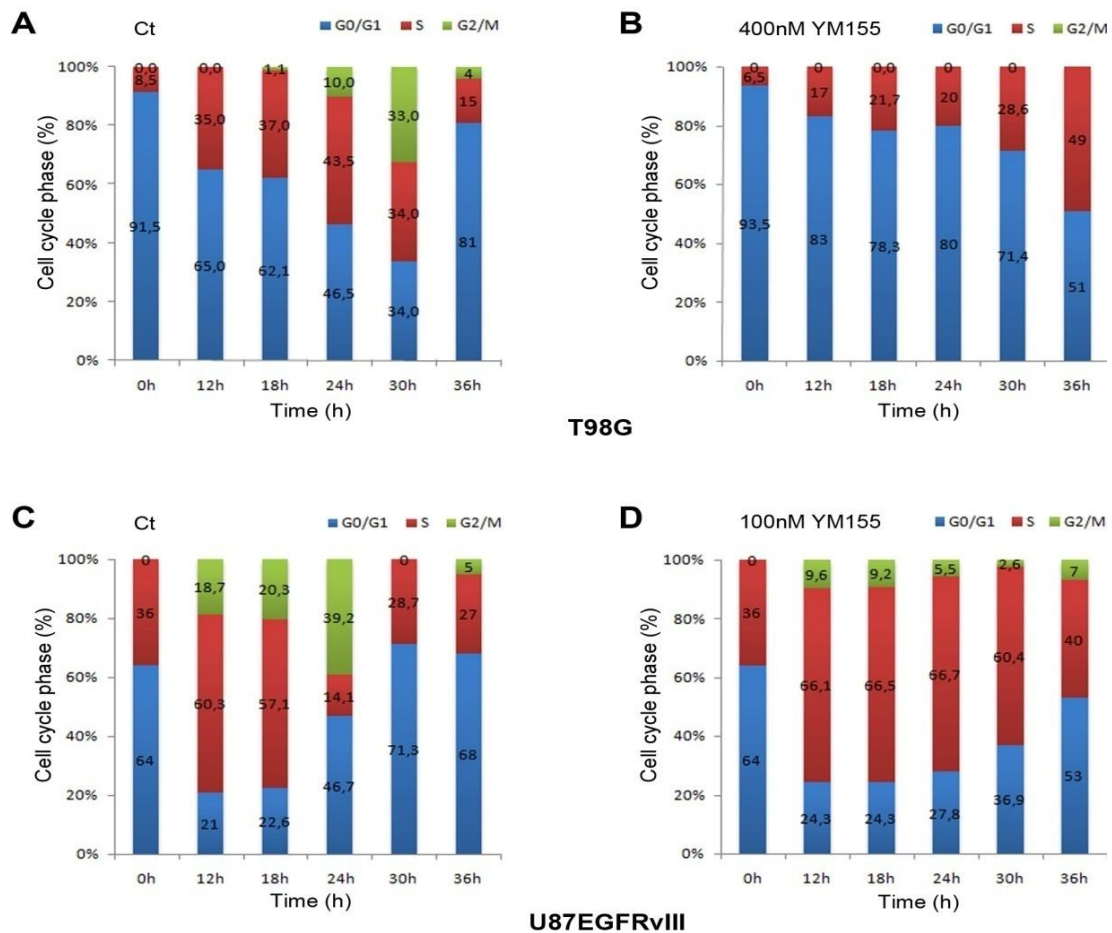


Figura 46. Anàlisi del cicle cel·lular després de l'exposició amb YM155 (5nM) o DMSO (control, Ct), en un time-course. Estudi de les fases del cicle està mesurat amb iodur de propidi per citometria de flux.

3.7 YM155 provoca canvis en el perfil d'expressió de mRNA de gens implicats en l'apoptosi

Després d'observar inducció de mort cel·lular per apoptosi, vàrem voler avaluar els canvis que YM155 induïa en el perfil de gens relacionats amb apoptosi. Les dosis de tractament escollides per a cada línia cel·lular varen ser aquelles en les que vam obtenir el màxim nivell d'apoptosi en l'anàlisi per citometria (U87-MG: 25nM; U87EGFRvIII: 100nM; T98G: 400nM; ANGM-CSS: 7,5 nM). Les cèl·lules es varen exposar durant 24 hores a YM155, i després s'extreu RNA es va analitzar el perfil de gens relacionats amb apoptosi mitjançant RT-MLPA.

El tractament amb YM155 va demostrar una disminució en el nivells d'expressió de mRNA de Survivina .Els altres membres de la família de les IAPs com XIAP no experimenten

canvis significatius. Per altra banda, HIAP1 disminueix lleugerament en les línies T98G i U87EGFRvIII, possiblement degut a que a la dosi de tractament utilitzada a més de inhibir el promotor de la Survivina tingui altres efectes inespecífics.

En quan a l'expressió del mRNA de CDKN1A no experimentà cap modificació significativa en cap de les línies cel·lulars avaluades, suggerint que p21 no participa en la parada de cicle induïda pel tractament amb YM155.

En quan als gens antiapoptòtics el canvi més destacable va ser la inducció del mRNA de PUMA en totes les línies cel·lulars. En les línies cel·lulars U87EGFRvIII, T98G i AGM-CSS és va observar també un augment de Bmf. Els nivells del mRNA de la proteïna pro-apoptòtic Noxa no van mostrar diferències destacables. És important remarcar que, en la línia cel·lular T98G es varen observar nivells elevats de Bcl-W i Bcl2, ambdues amb funció antiapoptòtica.

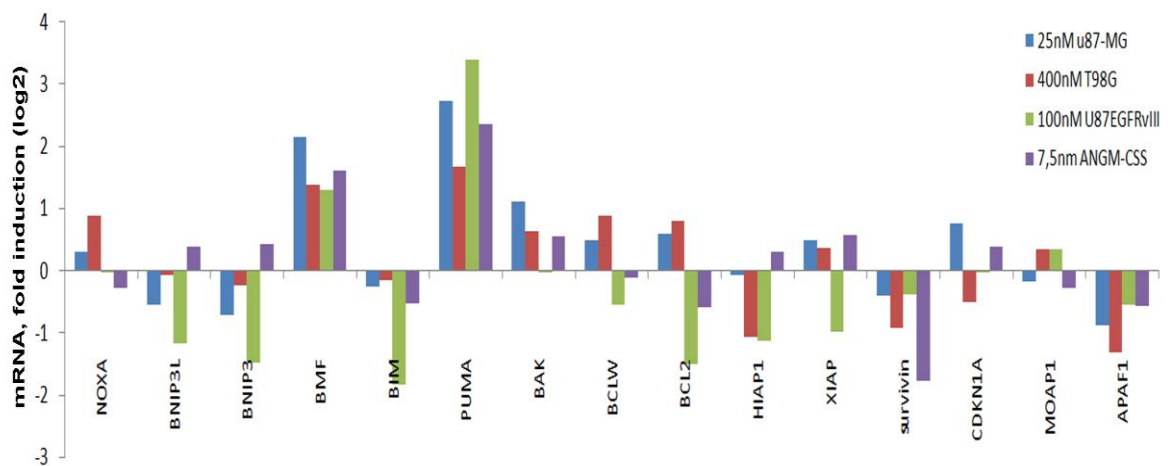


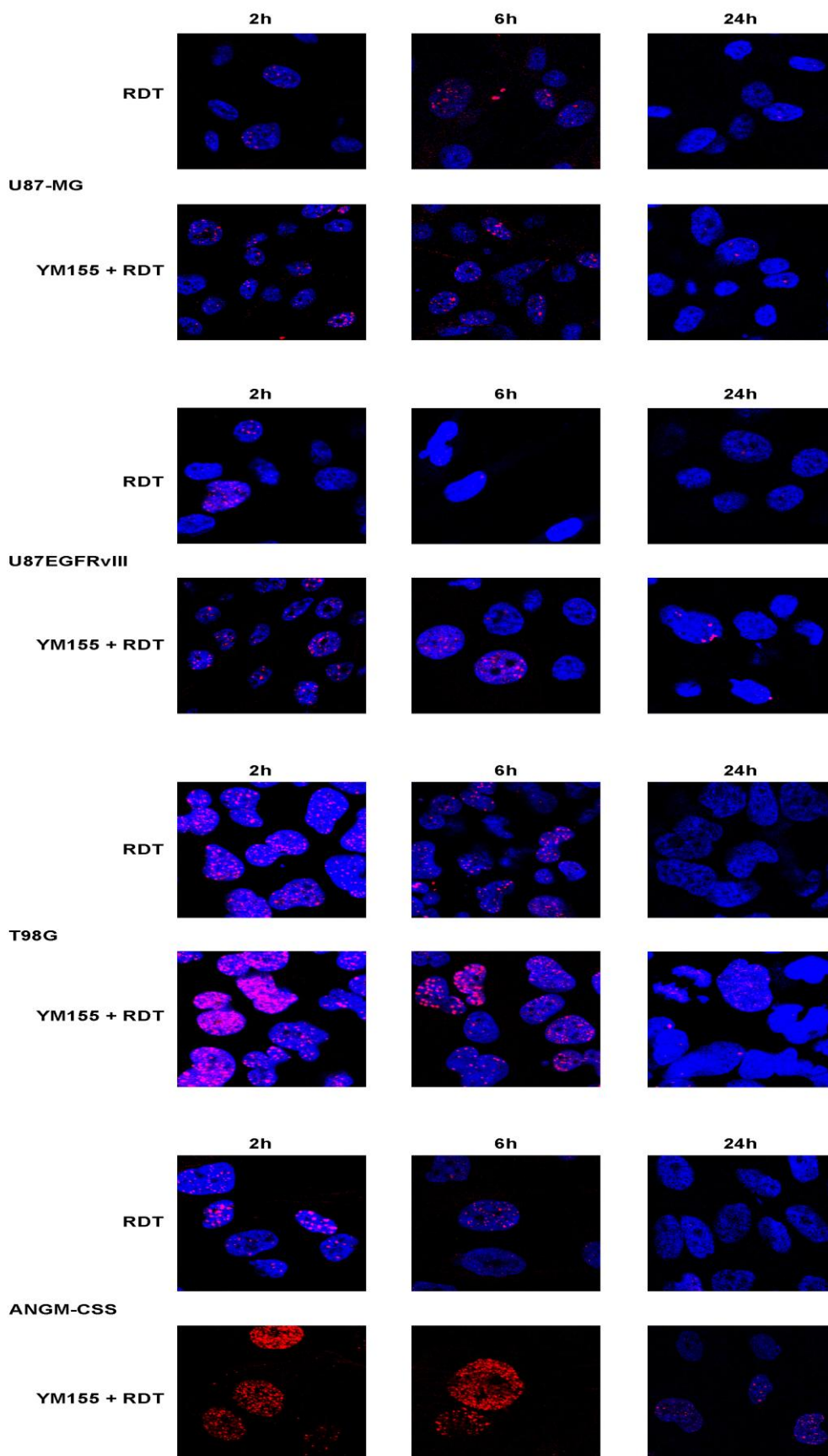
Figura 47. Anàlisi dels nivells de expressió del mRNA de gens implicats en el mecanisme d'apoptosi mitjançant RT-MLPA. Quantificació del mRNA expressada en logaritme en base 2 de la increment relatiu en relació als controls (tractats amb DMSO).

3.8 Efecte de YM155 en combinació amb radioteràpia

Tal com s'ha esmentat a la introducció, Survivina podria participar en el mecanisme de resistència a la radioteràpia observada en el pacients amb GBM (Chakarvarti A, 2004). En aquest sentit, i amb la intenció d'avaluar la capacitat radiosensibilitzadora de YM155, varem realitzar uns estudis preliminars pretractant les cèl·lules de glioma durant 48 hores amb YM155 a una dosi de 2nM, i posteriorment irradiant-les amb una dosi de 2Gy. Després de la

radioteràpia, es va procedir a la fixació de les cèl·lules en diferents temps entre 1 i 24 hores per després avaluar mitjançant immunofluorescència la presència de la forma fosforilada de la histona H2AX (Y-H2AX) en la formació de focus en resposta a lesions tipus DSB en el DNA. Per microscopia confocal es va avaluar el número de focus per cèl·lula als diferents temps postradioteràpia. La formació de focus de Y-H2AX va començar a ser visible en totes les línies cel·lulars entre 1 i 12 hores després d'irradiar-les. En presència de YM155 el nombre de focus per cèl·lula va ser molt més alt que amb radioteràpia sola. A més, en totes les línies cel·lulars avaluades, la preincubació amb YM155 va provocar una persistència del marcatge a les 24 hores post-radiació, a diferència de la radioteràpia sola on el marcatge retorna als nivells basals entre les 6 i les 12 hores (Figura 48A). L'avaluació del percentatge de focus per cèl·lula suggereix que YM155 sensibilitza les cèl·lules de glioma a la radioteràpia i retarda la reparació del DNA. (Figura 48B).

A



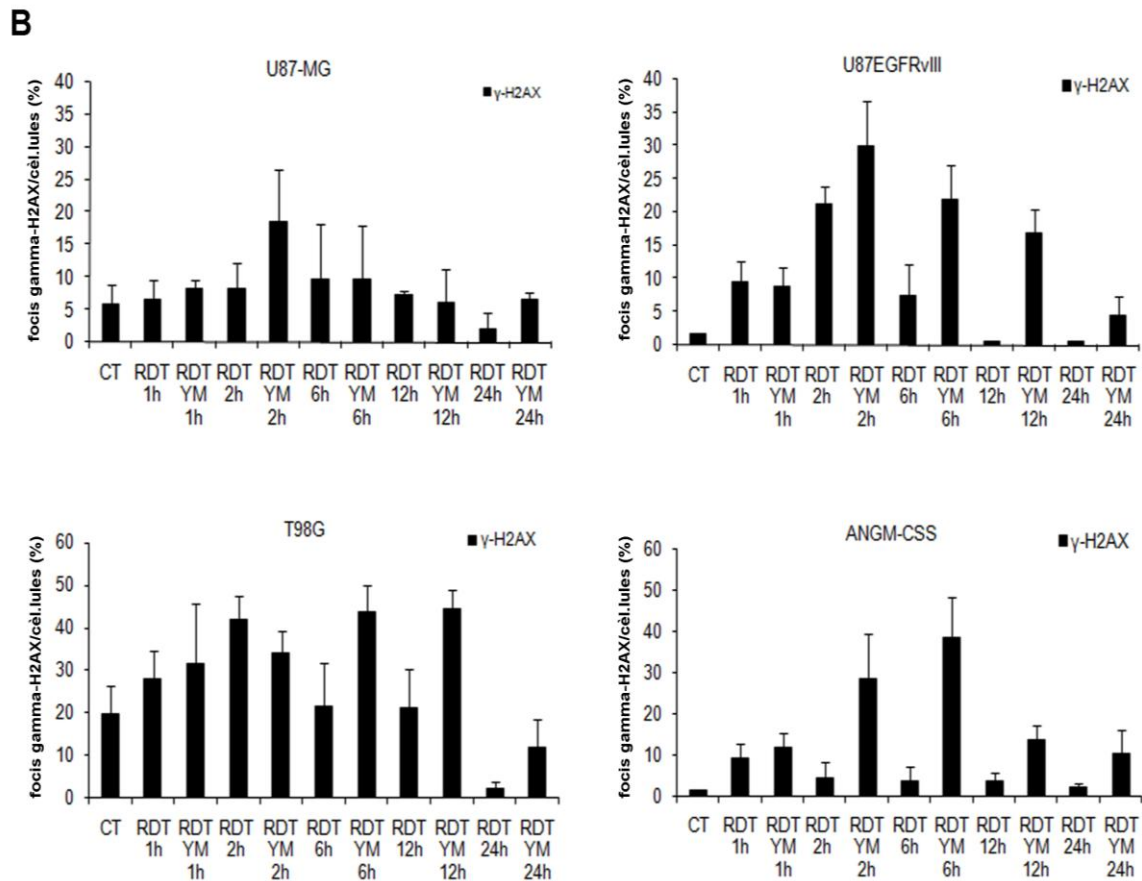


Figura 48. Efecte del YM155 en la formació de focis de Y-H2AX durant l'exposició a radiació en línies cel·lulars de glioma. Les línies cel·lulars van ser tractades amb DMSO (control) i amb 2 nM de YM155 durant 48 dies d'exposició, per més tard ser irradiades a 2Gy de radiació-Y. Després de la incubació es van fixar les cèl·lules per realitzar una immunofluorescència per el marcatge de Y-H2AX (fluorescència vermella). A) Observació amb microscòpia confocal de les línies cel·lulars marcades per a Y-H2AX a 63X. B) Inducció del nombre de focis de Y-H2AX per cèl·lula.

3.9 La inhibició de Survivina amb l'exposició de YM155 provoca una disminució en la viabilitat cel·lular i inducció d'apoptosi en el cultiu primari 35/1506

Estudis previs realitzats amb el cultiu primari 35/1506 (apartat Resultats 2.6) van demostrar que expressava nivells basals elevats de Survivina, que juntament amb el polimorfisme en codó el 72 del gen *TP53* i la presència d'amplificació del receptor salvatge de EGFR juntament amb la mutació EGFRvIII (veure annexe II) podrien ser factors que afavorissin a la resistència als tractaments.

En els estudis de YM155 realitzats prèviament en les línies cel·lulars vàrem observar que la línia U87EGFRVIII amb la variant de l'EGFR constitutivament activa necessitava dosis més altes de tractament per disminuir la seva viabilitat cel·lular així com per induir apoptosi a diferència de la mateixa línia sense el vector (U87-MG).

L'activitat antiproliferativa de YM155 va ser avaluada amb un assaig de MTT en el cultiu primari de glioblastoma 35/1506. Les cèl·lules varen ser exposades a dosis creixents de YM155 (de 2,5 a 1000nM) durant 24, 48 i 72 hores. Els resultats varen mostrar disminució viabilitat cel·lular (del 50% respecte el control) a la dosi més baixa de tractament (2,5mM). (Figura49)

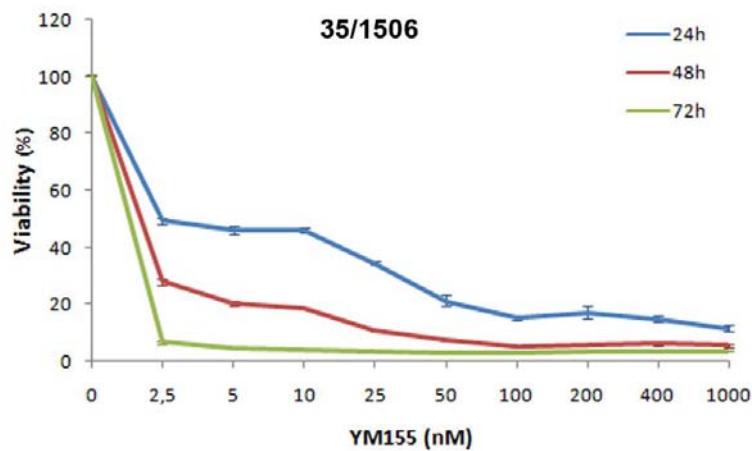


Figura 49. Anàlisi de la viabilitat cel·lular per assaig de MTT en el cultiu primari de glioblastoma 35/1506, tractat a dosis creixents de YM155 amb un període de tractament de 24, 48 i 72. Les gràfiques representen la mitjana de 3 experiments independents.

També es va avaluar la capacitat d'inducció d'apoptosi en el cultiu primari 35/1506 a diferents dosi de YM155 (de 1 a 10nM) i diferents temps d'exposició (24 i 48 hores). El recompte cel·lular va demostrar una disminució en el nombre de cèl·lules estadísticament significativa dosi i temps depenent en relació amb el control tractat amb DMSO. El YM155 també va induir l'externalització de la fosfatidilserina d'una forma dosi i temps depenent. La inducció d'apoptosi es va ser visible sobretot a les 48 hores de tractament a la dosi de 5nM (Figura 50B). Dosi superiors van induir sobretot mort per necrosi.

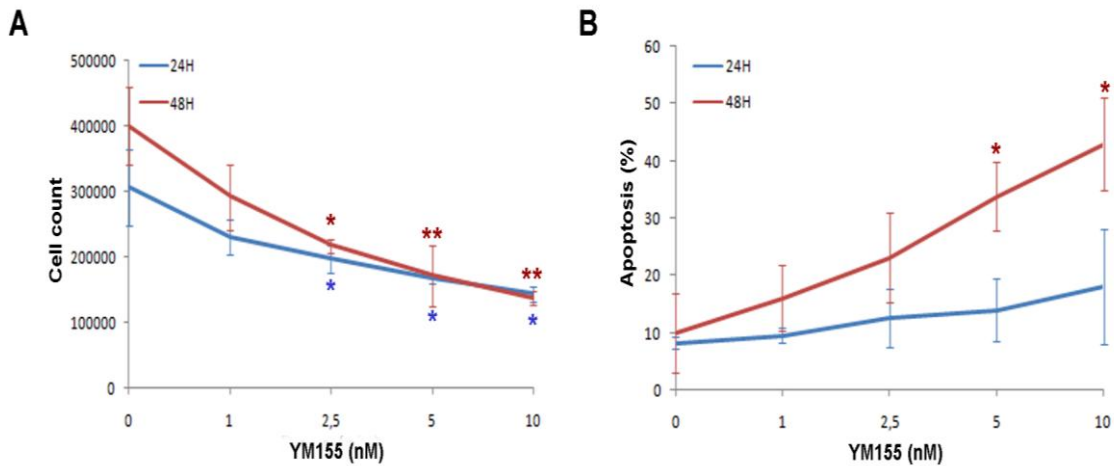


Figura 50. Efecte del inhibidor de Survivina YM155 sobre el cultiu primari de glioblastoma 35/1506. A) Recompte cel·lular del cultiu primari 35/1506 tractat amb DMSO (vehicle control) o amb dosis creixents de YM155 durant 24 i 48 hores. Mitjana de dos experiments independents. ** $p < 0.01$ (t de Student). B) Efecte de la Nutlina-3a en la inducció de l'apoptosi en el cultiu primari 35/1506 tractat amb DMSO (vehicle control) o amb dosis creixents de YM155 durant 24 i 48 hores. La dosi 0nM indica els controls no tractats (DMSO). Les gràfiques representen la mitjana de dos experiments independents. ** $p < 0.01$

3.10 L'exposició del cultiu primari 35/1506 al YM155, provoca una parada de cycle cel·lular

A les 24 hores de tractament amb YM155 el nombre de cèl·lules va disminuir significativament, però no va comportar una inducció d'apoptosi, pel què vàrem sospitar que podria haver una parada en el cycle cel·lular previ a la inducció de mort, tal com havíem observat en les línies cel·lulars.

Per avaluar els efectes de YM155 sobre el perfil del cycle cel·lular, el cultiu primari 35/1506 es va incubar amb 5nM a diferents temps (de 0 fins a 36 hores) i es va analitzar les variacions en el patró de cycle cel·lular. El tractament amb YM155 va induir una aturada del cycle cel·lular en la fase G0/G1 a partir de les 12 hores d'incubació que va persistir fins a les 36 hores de tractament.

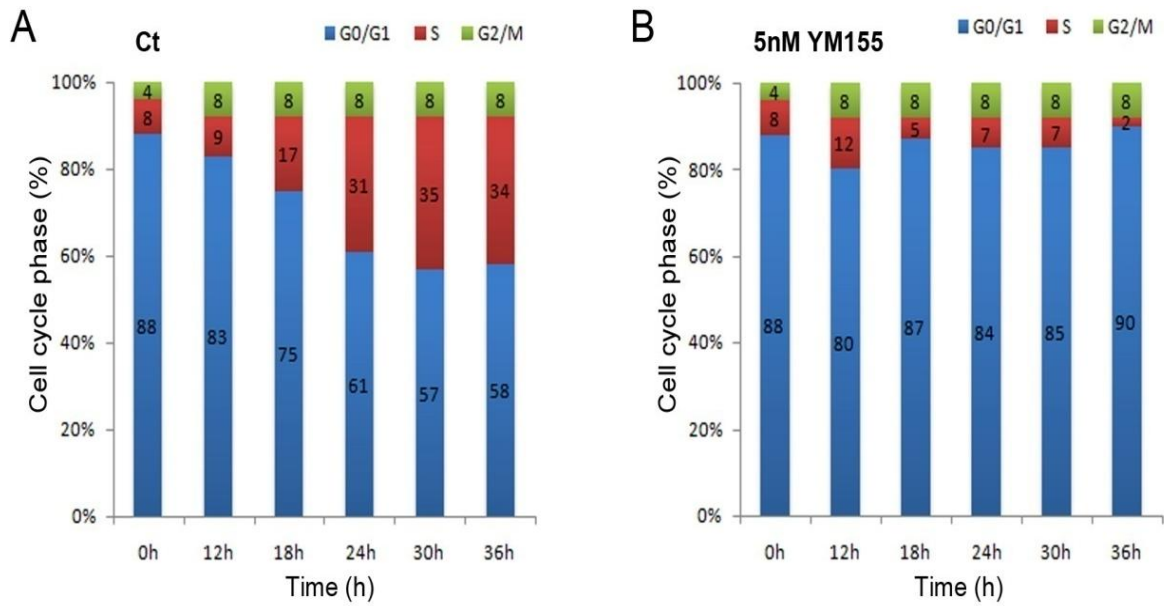


Figura 51. Anàlisi del cicle cel·lular després de l'exposició amb YM155 (5nM) o DMSO (control, Ct), en un time-course. Estudi de les fases del cicle està mesurat amb iodur de propidi per citometria de flux.

3.11 El tractament amb YM155 indueix canvis en el patró de mRNA de gens apoptòtics en el cultiu 35/1506

El tractament amb YM155 en el cultiu primari 35/1506, va ocasionar una disminució en la viabilitat cel·lular, aturada del cicle cel·lular en G0/G1 a més d'una inducció d'apoptosi. Posteriorment vàrem estudiar variacions induïdes per YM155 en l'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi mitjançant RT-MLPA. El resultats mostren una disminució de mRNA de la Survivina, sense observar-se modificacions en l'expressió de HIAP1 i XIAP. En quan als gens proapoptòtics sols s'observa un augment en l'expressió del mRNA de BAK, PUMA i Bmf sense observant-se canvis en els mRNA de PUMA i Noxa. Finalment, l'estudi demostra també una disminució del mRNA de CDKN1A, el que suggereix que p21 no és el gen implicat en la parada de cicle en G0/G1.

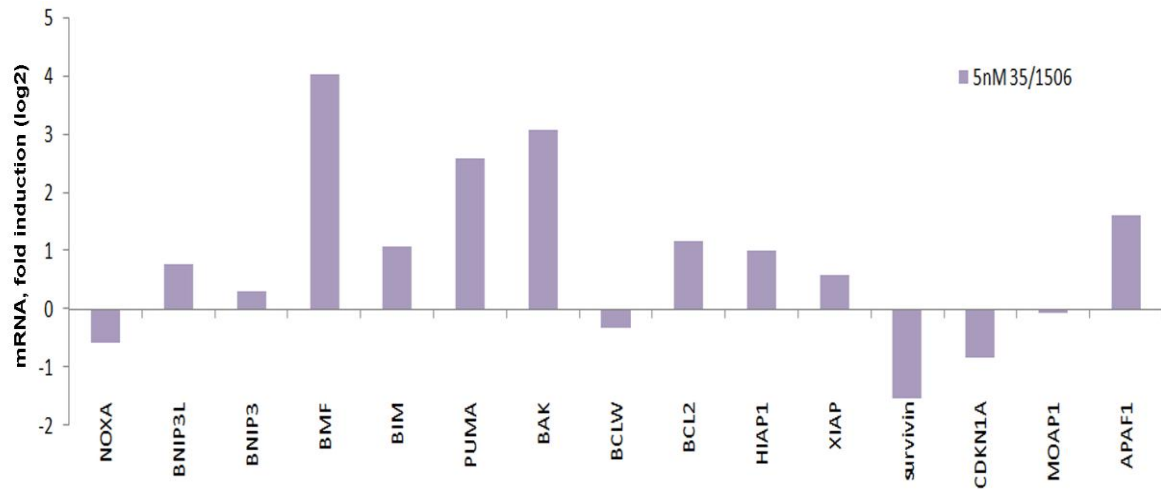


Figura 52. Anàlisi dels nivells de expressió del mRNA de gens implicats en el mecanisme d'apoptosi mitjançant RT-MLPA. Quantificació del mRNA expressada en logaritme en base 2 de la increment relatiu en relació als controls (tractats amb DMSO).