



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



***Estudios del tipo de muerte celular, en células de glioblastoma, promovida por derivados sintéticos de inhibidores de tirosina quinasas***

*Bach. Catalina Isadora Alamón Lima*

Tutor: Dr. Marcos Couto

Co-tutor: Prof. Dr. Hugo Cerecetto

Laboratorio de Química Orgánica Medicinal, IQB, Facultad de Ciencias, UdelaR,  
Montevideo, Uruguay

10/04/2020

## Índice

1. <u>Agradecimientos</u>	(4)
2. <u>Resumen</u>	(5)
3. <u>Abreviaturas</u>	(6)
4. <u>Introducción</u>	(8)
4.1 <i>Muerte celular: generalidades y tipos de mecanismos</i>	(8)
4.1.1. Apoptosis	(9)
4.1.2. Necrosis	(10)
4.1.3. Autofagia	(11)
4.1.4. Técnicas para distinguir apoptosis y necrosis	(12)
4.2. <i>Citometría de flujo: principios y aplicaciones en la distinción entre apoptosis y necrosis.</i>	(13)
4.2.1. Cambios en la morfología celular	(13)
4.2.2. Seguimiento de marcadores intracelulares	(13)
4.2.3. Seguimiento de marcadores de membrana celular	(14)
4.3. <i>Resonancia magnética nuclear: principios y aplicaciones en la distinción entre apoptosis y necrosis</i>	(16)
4.3.1. <sup>1</sup> H-RMN de suspensiones celulares: señales asociadas a la muerte celular	(19)
4.3.2. Señales asociadas a la apoptosis: consensos y controversias	(20)
4.3.3. Señales asociadas a la necrosis: consensos y controversias	(23)
4.3.4. Criterios definidos para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular de un cultivo celular por <sup>1</sup> H-RMN	(25)
4.4. <i>Glioblastoma multiforme (GBM)</i>	(27)
4.4.1. Generalidades	(27)
4.4.2. Tratamiento	(29)
4.4.3. Terapia por captura neutrónica de boro (BNCT)	(35)
5. <u>Antecedentes</u>	(37)
6. <u>Objetivos</u>	(39)
6.1 <i>Objetivo general</i>	(39)
6.2 <i>Objetivos específicos</i>	(39)

7	<u>Materiales y métodos</u>	(40)
	7.1 <i>Cultivo celular</i>	(40)
	7.2 <i>Citotoxicidad celular y determinación de las IC<sub>50</sub></i>	(41)
	7.3 <i>Estudios del tipo de mecanismo de muerte celular por citometría de flujo</i>	(42)
	7.4 <i>Estudios del tipo de mecanismo de muerte celular por <sup>1</sup>H-RMN</i>	(44)
	7.5 <i>Ensayos de microscopía confocal</i>	(46)
	7.6 <i>Análisis estadístico</i>	(47)
8	<u>Resultados y discusión</u>	(48)
9	<u>Conclusiones y perspectivas</u>	(97)

## **1. Agradecimientos**

A mis padres Guido y Silvia, mi hermana Josefina, a mis abuelos y a toda mi familia por acompañarme y brindarme su apoyo incondicional en todos los momentos.

A Mercedes González y Hugo Cerecetto por brindarme la oportunidad de realizar mi tesina de grado en el Laboratorio de Química Orgánica Medicinal y por brindarme su apoyo constante durante el desarrollo de la misma.

A mi amigo y tutor de tesis Marcos Couto, por su confianza, paciencia, dedicación y ante todo su mentalidad positiva en todo momento.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Mariana, Gonzalo y Elena, con quienes compartimos el trabajo diario, y por estar presentes en los buenos momentos, y también en los difíciles.

A mis amigas Mariana y Camila, con quienes compartimos toda la carrera.

A mis amigas Sofía, Florencia y Juliana, quienes supieron apoyarme en todo momento.

Muy especialmente al grupo de Neurodegeneración del Institut Pasteur de Montevideo, particularmente a Mariángeles Kovacs, quienes me brindaron la posibilidad de desarrollar parte de los experimentos en su laboratorio, así como me ayudaron a realizar el análisis de los resultados de los mismos.

A Paula Céspedes, perteneciente a la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo, quien me ayudó a realizar los experimentos de citometría de flujo así como a realizar su análisis.

A Ana Ramón y Manuel Sanguinetti, por haber participado en mi formación como investigadora, quienes me permitieron realizar una pasantía de investigación en su laboratorio.

¡Muchas gracias a todos por su aporte!

## 2. Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM), un tipo de tumor cerebral grado IV de acuerdo a la clasificación de la OMS, actualmente es tratado de forma paliativa e ineficiente a través de resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia, utilizándose el agente alquilante temozolomida (TMZ). Varias terapias alternativas han sido planteadas en vista de mejorar su tratamiento: entre ellas se encuentran la terapia dirigida con inhibidores de tirosina quinasas (TKIs) y la terapia por captura neutrónica de boro (BNCT).

Dentro del contexto anterior, en el Laboratorio de Química Orgánica Medicinal se sintetizaron derivados de fármacos antitumorales de uso extensivo (erlotinib, lapatinib y sunitinib). Tales derivados se diseñaron teniendo en mente su posible aplicación en una terapia dual, que comprenda tanto la terapia dirigida hacia tirosina quinasas como la BNCT. Por ello, los compuestos contienen en su estructura clústeres de boro, estructuras ricas en boro, lo que permiten la posible aplicación de los mismos como agentes dadores de boro para la BNCT.

Debido a que es relevante conocer el mecanismo de muerte celular que estos compuestos promueven en las células de glioblastoma, en esta tesina de grado se plantea el estudio de los mismos por diferentes técnicas. Así, inicialmente, se evalúa la toxicidad de las series derivadas de sunitinib y lapatinib frente a la línea celular U87 MG, la cual consiste de un modelo *in vitro* de glioblastoma multiforme. Posteriormente, se estudia el tipo de muerte celular de los dos derivados más citotóxicos junto con los fármacos padres de los que derivan. Para ello, se utilizan las técnicas de citometría de flujo, de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y de microscopía confocal.

Mediante las tres técnicas utilizadas se obtienen indicios congruentes acerca del mecanismo de muerte celular que estos dos derivados, sunitinib y lapatinib son capaces de inducir en las células U87 MG. Se llega a la conclusión que el derivado **3** y sunitinib son capaces de matar por apoptosis, mientras que el derivado **11** y lapatinib son capaces de matar por necrosis.

Palabras claves: muerte celular, apoptosis, necrosis, autofagia, glioblastoma multiforme, terapia dirigida, terapia por captura neutrónica de boro, citometría de flujo,  $^1\text{H}$ -RMN, microscopía confocal.

### 3. Abreviaturas

**ADP:** del inglés *adenosine diphosphate*.

**ATCC:** del inglés *American Tissue Culture Collection*.

**ATP:** del inglés *adenosine triphosphate*.

**BSA:** del inglés *bovine serum albumin*; en español *seroalbúmina bovina*.

**BNCT:** del inglés *boron neutron capture therapy*; en español *terapia por captura neutrónica de boro*.

**BPA:** *p*-boronofenilalanina.

**BSH:** sulfidrilborano.

**CH<sub>2</sub>:** protones de los metilenos de los lípidos móviles.

**CH<sub>3</sub>:** protones de los metilos de los lípidos móviles.

**Cho:** protones de los metabolitos colina y fosfocolina.

**c-Kit:** del inglés *mast/stem cell growth factor receptor*

**CpG:** regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos.

**<sup>13</sup>C-RMN:** resonancia magnética nuclear de carbono 13.

**CTP:** del inglés *cytidine triphosphate*.

**DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol.

**DAG:** diacilglicerol.

**δ:** desplazamiento químico en espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

**DMEM:** del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**DR(s):** del inglés *death receptor(s)*; en español *receptor(es) de muerte*.

**EDTA:** del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*; en español *ácido etilendiaminotetraacético*.

**EGFR:** del inglés *epidermal growth factor receptor*.

**FBS:** del inglés *fetal bovine serum*; en español *suero fetal bovino*.

**FITC:** del inglés *fluorescein isothiocyanate*; en español *isotiocianato de fluoresceína*.

**FSC:** del inglés *forward scattered light*.

**FLT3:** del inglés *fms like tyrosine kinase 3*.

**GBM:** glioblastoma multiforme.

**GPC:** protones de la glicerofosfocolina.

**HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico.

**Her2:** del inglés *human epidermal growth factor receptor 2*, también conocido como EGFR-2.

**<sup>1</sup>H-MRS:** del inglés *Magnetic Resonance Spectroscopy*.

**<sup>1</sup>H-RMN:** resonancia magnética nuclear de protón.

**IC<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria media máxima, definida como la dosis de compuesto a la cual la supervivencia celular es del 50 %.

**IDH:** isocitrato deshidrogenasa.

**Lac:** protones metílicos del ácido láctico o lactato.

**LC3:** del inglés *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*.

**MET:** microscopía electrónica de transmisión.

**MGMT:** O<sup>6</sup>-metilguanina metiltransferasa.

**MRI:** del inglés *magnetic resonance imaging*; en español *imagen por resonancia magnética*.

**MTKI(s):** del inglés *multiple tyrosine kinase inhibitor(s)*; en español *inhibidor(es) múltiple(s) de tirosina quinasa(s)*.

**PBS:** del inglés *Phosphate Buffered Saline*.

**PDGF:** del inglés *platelet-derived growth factor*.

**PDGFR:** del inglés *platelet-derived growth factor receptor*.

**PI:** del inglés *propidium iodide*; en español *ioduro de propidio*.

**PI3K-Akt:** vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa- Akt, también conocida como vía Akt.

**PP<sub>i</sub>:** del inglés *inorganic pyrophosphate*.

**PTEN:** del inglés *phosphatase and tensin homologue on chromosome 10*.

**<sup>31</sup>P-RMN:** resonancia magnética nuclear de fósforo 31.

**RIP3:** del inglés *receptor-interacting protein kinase 3*.

**SRB:** sulforodamina B.

**SSC:** del inglés *side scattered light*.

**TKI(s):** del inglés *tyrosine kinase inhibitor(s)*; en español *inhibidor(es) de tirosina quinasa(s)*.

**TMZ:** temozolomida.

**VEGF:** del inglés *vascular endothelial growth factor*.

**VEGFR:** del inglés *vascular endothelial growth factor receptor*.

## 4. Introducción

### 4.1 Muerte celular: generalidades y tipos de mecanismos

El proceso de muerte celular es un proceso de vital importancia para organismos multicelulares, ya que el mismo permite el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, así como promueve la remoción de células potencialmente dañinas. Aunque dicho proceso puede ser desencadenado por daño celular extremo, por lo general el proceso de muerte celular se trata de un proceso activo, en el cual la célula, según las señales intracelulares o extracelulares, o ambas, que reciba, responde con la activación de cascadas de señalización, que llevan a la puesta en marcha de alguno de los mecanismos de muerte celular <sup>(1-3)</sup>.

Existen tres mecanismos principales de muerte celular, definidos según la apariencia de las células en el proceso de muerte: apoptosis, necrosis y autofagia <sup>(1-3)</sup> (Figura 1). Mientras que la apoptosis y la autofagia pueden ser distinguidas por ciertos eventos bioquímicos, diferenciar la necrosis es más complejo, debido a la dificultad que existe en definir las bases del proceso necrótico <sup>(2)</sup>.

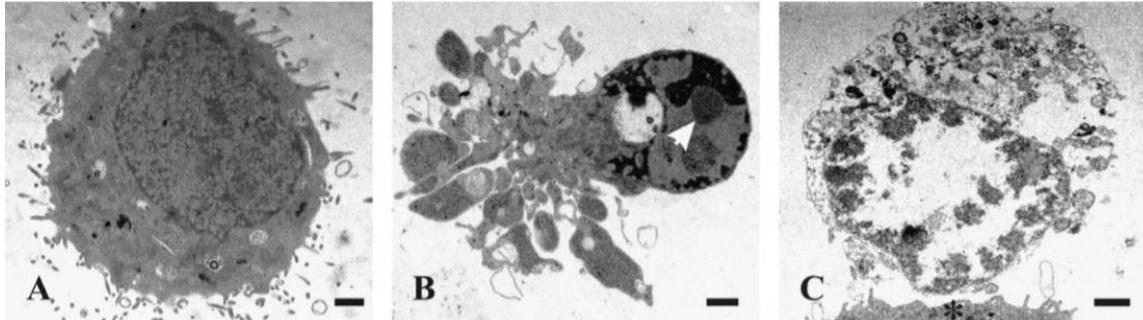


Figura 1: Microscopías electrónicas de transmisión (MET) para células en diferentes estadios. **A.** Célula de fibrosarcoma viva, donde se puede observar un núcleo heterocromático bien definido y organelos citoplasmáticos bien preservados. **B.** Célula de fibrosarcoma en apoptosis, donde se puede observar la cromatina condensada y la formación de cuerpos apoptóticos. **C.** Célula de fibrosarcoma en necrosis, donde se puede ver claramente la pérdida de la integridad de membrana plasmática. La barra se corresponde con 1  $\mu$ m. Imagen extraída de ref. <sup>(2)</sup> Krysko, D. V., et al (2008).

---

<sup>(1)</sup> Green, D. R. et al. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect in Biol*, 7(12), a006080. <sup>(2)</sup> Krysko, D. V. et al. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221. <sup>(3)</sup> Alberts, B. et al. (2008). *Molecular biology of the cell*. Fifth Edition: Garland Pub Inc, London.

#### 4.1.1 Apoptosis

La apoptosis constituye una vía de muerte celular programada <sup>(3)</sup>. Se caracteriza por presentar contracción celular y formación de ampollas en la membrana, como consecuencia del desacoplamiento localizado del citoesqueleto con la membrana plasmática. A su vez, se observa condensación de la cromatina, proceso denominado picnosis, junto con la marginación de la misma a la membrana nuclear, fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos <sup>(1-3)</sup> (Figura 1-B). También se observan cambios a nivel de la organización de los fosfolípidos en la membrana, ocurriendo una externalización de la fosfatidilserina <sup>(2, 3)</sup>.

Existen dos grandes vías de señalización que llevan a la activación del mecanismo de muerte celular por apoptosis: la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca, la cual involucra un receptor de muerte (DRs, del inglés *death receptors*) <sup>(1, 3)</sup>. Cuando la apoptosis es activada por la vía de los DRs, requiere la unión de un ligando a dicho receptor para que el proceso suceda, mientras que la activación del proceso apoptótico por la vía intrínseca depende de que se liberen al citosol proteínas mitocondriales que normalmente se encontrarán en el espacio intermembrana de la mitocondria. Un ejemplo es el citocromo C que se libera frente a señales proapoptóticas <sup>(1, 3)</sup>. Cualquiera de las vías por la cual se active la apoptosis, lleva a la activación de la familia de las caspasas, proteínas encargadas de llevar a cabo el proceso de muerte celular <sup>(1-3)</sup>. Las caspasas son cisteín-proteasas sintetizadas como proenzimas y son activadas por la acción de otras caspasas, formándose de esta forma una cascada de amplificación <sup>(3)</sup>.

Por lo tanto, desde un punto de vista bioquímico, la apoptosis se caracteriza por:

- la activación de caspasas: en particular, la medida de la actividad de la caspasa-3 sirve como indicativo de la activación de un proceso apoptótico <sup>(1-4)</sup>.

---

(1). Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4). Rainaldi, G. *et al.* (2008). Metabolomics using <sup>1</sup>H-NMR of apoptosis and necrosis in HL60 leukemia cells: differences between the two types of cell death and independence from the stimulus of apoptosis used. *Radiat Res*, 169(2), 170-180.

- observarse un patrón de digestión del ADN cromosómico: una endonucleasa, caspasa dependiente, corta el ADN cromosómico en fragmentos de tamaños que son múltiplo del tamaño de los nucleosomas. Dicho patrón de cortes puede ser evidenciado a través de un gel de agarosa <sup>(2-4)</sup>.
- externalización de la fosfatidilserina: normalmente se encuentra en la cara citosólica de la membrana plasmática y pasa a encontrarse en la cara extracelular en el proceso de apoptosis. Este proceso es utilizado como señal para células fagocíticas, como los macrófagos, para que fagociten a la célula en proceso de muerte celular <sup>(2, 3)</sup>.
- las células en apoptosis normalmente pierden el potencial de membrana que existe a nivel de la membrana mitocondrial interna. Esto puede ser evidenciado utilizando marcadores fluorescentes, con carga positiva, los cuales únicamente se acumulan en la mitocondria cuando el potencial de membrana permanece incambiado <sup>(2, 3)</sup>.
- el citocromo C pasa a ubicarse en el citosol en células apoptóticas, a diferencia de células vivas donde se ubica en el espacio intermembrana mitocondrial <sup>(1, 3)</sup>.

#### 4.1.2 Necrosis

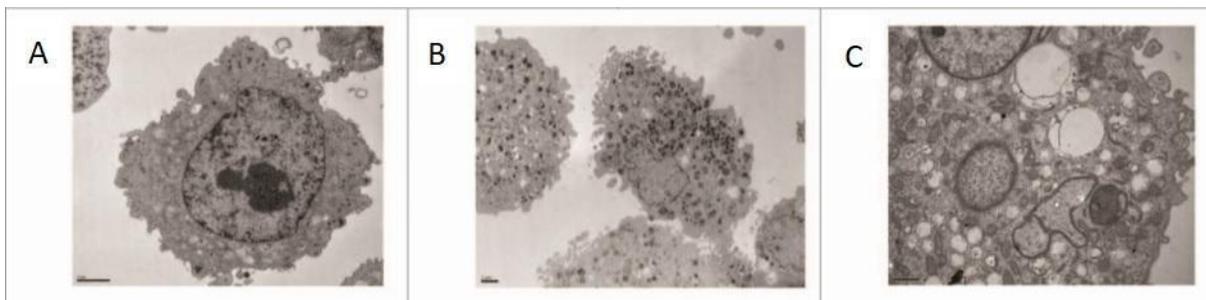
En contraste a la apoptosis, las células pueden morir accidentalmente por necrosis, un proceso que deviene en la lisis celular que provoca una respuesta inflamatoria <sup>(3)</sup>. La necrosis se caracteriza por observarse desequilibrio hidroelectrolítico (conocido en inglés como *cell swelling*), ruptura de la membrana celular y pérdida de la estructura en organelos de la célula <sup>(1-4)</sup> (Figura 1-C). La necrosis puede ser activada ante un daño celular extremo <sup>(3)</sup>, así como por la activación de varias vías de señalización por señales dadas por una interacción receptor-ligando, las cuales llevan a la activación de la RIP3 (del inglés *receptor-interacting protein kinase 3*) <sup>(1)</sup>. La activación de dicha proteína también puede darse por daño en el ADN así como por la aparición de ADN en el citosol <sup>(1)</sup>. A diferencia de la apoptosis y la autofagia, no se han descrito marcadores bioquímicos que permitan la clara distinción de la necrosis de otros tipos de mecanismo de muerte celular <sup>(2)</sup>.

---

(1). Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4). Rainaldi, G. *et al.* (2008).

### 4.1.3 Autofagia

La autofagia es una forma de autodegradación, responsable del recambio de organelos y macromoléculas <sup>(5)</sup>. Se trata de un mecanismo de supervivencia celular, el cual, en el caso de células expuestas a condiciones de estrés, puede determinar su muerte ya sea por la propia autofagia, o por otro tipo de mecanismo de muerte, como apoptosis o necrosis <sup>(2, 5)</sup>. Sin embargo, su función como mecanismo de muerte celular es aún controversial, ya que en la mayoría de los casos descritos, se trata de un proceso que acompaña a la muerte celular en lugar de causarla. <sup>(1, 2)</sup> La autofagia, se caracteriza por la formación de vesículas intracelulares y la puesta en funcionamiento de la maquinaria autofágica (Figura 2) <sup>(1, 2)</sup>. Al igual que la apoptosis, tiene sus propios marcadores bioquímicos, siendo la localización de la proteína LC3 (del inglés *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) y su lipidación algunos de los que se pueden seguir <sup>(2, 5)</sup>.



**Figura 2:** Análisis de la muerte celular por autofagia por MET. **A.** Célula U87 MG viva. **B.** Célula U87 MG en autofagia, donde se puede observar la presencia de vesículas intracelulares con y sin contenido citoplasmático, característico de la autofagia. **C.** Magnificación de la célula observada en **B.** La barra se corresponde con 2  $\mu\text{m}$  en las imágenes **A** y **B**, y con 1  $\mu\text{m}$  para la imagen **C.** Imagen extraída de ref. <sup>(5)</sup> Eimer, S. et al (2011).

---

<sup>(1)</sup>. Green, D. R. et al. (2015). <sup>(2)</sup> Krysko, D. V. et al. (2008). <sup>(5)</sup> Eimer, S. et al. (2011). Autophagy inhibition cooperates with erlotinib to induce glioblastoma cell death. *Cancer Biol Ther*, 11(12), 1017-1027.

#### 4.1.4 Técnicas para distinguir apoptosis y necrosis

En la bibliografía existen numerosas técnicas que han sido aplicadas en el estudio del tipo de mecanismo de muerte celular. Se pueden mencionar, entre otras: microscopía de *time lapse*, citometría de flujo, MET y *western blot* <sup>(2, 6-9)</sup> (Figuras 1 y 2). De estas últimas, la citometría de flujo se puede considerar como la técnica de elección en la actualidad. Otra alternativa adicional a las anteriormente planteadas es mediante la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN) <sup>(4, 10-24)</sup>.

---

(2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184(1), 39-51. (7) Van Engeland, M. *et al.* (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24(2), 131-139. (8) Baskić, D. *et al.* (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int*, 30(11), 924-932. (9) Hawley, T. S. *et al.* (2018). Flow Cytometry Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, (Walker, J. M., editor), 4a Ed. Humana Press. Editors: Hawley, Teresa S., Hawley, Robert G. (Eds.) (10) Shih, C. *et al.* (2005). Detection of apoptosis and necrosis in normal human lung cells using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Ann NY Acad of Sci*, 1042(1), 488-496. (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood*, 87(5), 1951-1956. (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Cell Death and Differ*, 8(3), 219. (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). <sup>1</sup>H-NMR detection of mobile lipids as a marker for apoptosis: the case of anticancer drug-loaded liposomes and polymeric micelles. *Mol Pharm*, 6(6), 1876-1882. (14) Ronen, S. M. *et al.* (1999). Magnetic resonance detects metabolic changes associated with chemotherapy-induced apoptosis. *Br J Cancer*, 80(7), 1035. (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). Techniques: visualizing apoptosis using nuclear magnetic resonance. *Trends Pharmacol*, 24(3), 146-149. (16) Hakumäki, J. M. *et al.* (2000). <sup>1</sup>H-NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem*, 25(8), 357-362. (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). Increases in NMR-visible lipid and glycerophosphocholine during phenylbutyrate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Bioch Biophys Acta*, 1734(1), 1-12. (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). <sup>1</sup>H-MRS-visible lipids accumulate during apoptosis of lymphoma cells in vitro and in vivo. *Magn Reson Med*, 54(1), 43-50 (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). Apoptosis is associated with triacylglycerol accumulation in Jurkat T-cells. *Br J Cancer*, 86(6), 963. (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). Analysis of <sup>1</sup>H-NMR-detectable mobile lipid domains for assessment of apoptosis induced by inhibitors of DNA synthesis and replication. *Cell Biol Int*, 29(1), 33-39. (21) Lutz, N. W. *et al.* (2003). Early changes in glucose and phospholipid metabolism following apoptosis induction by IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  in HT-29 cells. *FEBS Lett*, 544(1-3), 123-128. (22) Nunn, A. V. *et al.* (1996). Characterisation of secondary metabolites associated with neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*, 392(3), 295-298. (23) Di Vito, M. *et al.* (2001). <sup>1</sup>H-NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells. *Bioch Biophys Acta*, 1530(1), 47-66. (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood*, 89(10), 3778-3786.

## **4.2 Citometría de flujo: principios y aplicaciones en la distinción entre apoptosis y necrosis.**

La citometría de flujo se basa en la iluminación de partículas o células por una fuente de luz, las cuales en respuesta emiten o dispersan luz. La luz emitida o dispersada por partículas o células es analizada y captada por detectores adecuados. Células que se encuentren sufriendo un proceso apoptótico así como un proceso necrótico pasan por una serie de eventos, los cuales determinan cambios detectables por citometría de flujo si se utilizan los métodos de detección adecuados para evidenciar los procesos deseados <sup>(9)</sup>.

### 4.2.1 Cambios en la morfología celular

Los cambios morfológicos ocurridos en células apoptóticas y necróticas pueden ser detectados por citometría de flujo, ya que tales cambios repercuten en las propiedades de dispersión de la luz por parte de las células. Por ejemplo, la FSC (del inglés *forward scattered light*) se relaciona con el tamaño celular y permite diferenciar vesículas, cuerpos apoptóticos y células apoptóticas. A su vez, la contracción celular también es detectable por la FSC. Sin embargo, es difícil distinguir una muestra compleja que presente poblaciones necróticas y apoptóticas, ya que las células necróticas secundarias, parte final del proceso apoptótico, se superponen con las células necróticas <sup>(2)</sup>.

### 4.2.2 Seguimiento de marcadores intracelulares

Dentro de los marcadores intracelulares de la apoptosis se encuentran la fragmentación del ADN en tamaños discretos múltiples del tamaño del nucleosoma, la activación de las caspasas, el clivaje de la proteína Bid en su forma truncada proapoptótica y la liberación de citocromo C, entre otros descriptos anteriormente <sup>(1-4, 6-10)</sup>. Todas estas características permiten diferenciar la apoptosis de la necrosis.

---

(1) Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (7) Van Engeland, M. *et al.* (1996). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Hawley, T. S. *et al.* (2018). (10) Shih, C. *et al.* (2005).

Por citometría de flujo se puede seguir la fragmentación del ADN detectando el ADN hipoploide después de adherir yoduro de propidio (PI, del inglés *propidium iodide*) a las células en proceso de muerte y permeabilizarlas con frío. El PI se intercala en el ADN y el tamaño de los fragmentos de ADN aparecen como un histograma de ADN hipoploide. En contraste, las células necróticas mantienen un patrón bifásico similar al de una población de células dividiéndose de forma no sincronizada <sup>(2, 8, 9)</sup>. Otra posibilidad de seguir la fragmentación en el ADN ocurrido en células apoptóticas es mediante geles de agarosa, donde se establece una escalera de fragmentos de ADN <sup>(2, 4, 8, 11)</sup>.

#### 4.2.3 Seguimiento de marcadores de membrana celular

En las etapas tempranas de la apoptosis ocurren varios cambios a nivel de la membrana, como por ejemplo cambios a nivel de la fluidez de la misma y en su constitución <sup>(1-4, 6, 8)</sup>. Dentro de este último cambio, en particular, la externalización de la fosfatidilserina es un cambio detectable por citometría de flujo <sup>(2, 6, 7-9)</sup>.

La fosfatidilserina es un aminofosfolípido que normalmente reside en la cara citosólica de la membrana plasmática en células vivas. Durante la apoptosis, la fosfatidilserina es externalizada: se han propuesto varios mecanismos, relacionados a un aumento del *flip flop* de los fosfolípidos debido a la inactivación de la aminofosfolípido translocasa y a la presencia de un transportador de aminofosfolípidos. La fosfatidilserina es un marcador temprano de la apoptosis <sup>(2, 6)</sup>. Puede ser detectado por anexina V, una proteína de unión a fosfolípidos calcio dependiente <sup>(2, 6, 8)</sup>. La anexina V es conjugada a un fluorocromo para ser usada como tinción para citometría de flujo para detectar la externalización de la fosfatidilserina.

---

(1). Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (7) Van Engeland, M. *et al.* (1996). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Hawley, T. S. *et al.* (2018). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11). Blankenberg, F. G. *et al.* (1996).

Sin embargo, existe el inconveniente que la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática no es un proceso que únicamente ocurre en la apoptosis, sino que también ocurre en la necrosis <sup>(2, 6)</sup>. A pesar que en ambos mecanismos de muerte sucede la externalización de la fosfatidilserina, existen diferencias en tiempo y características del proceso. Durante las etapas iniciales de la apoptosis, ocurre la externalización de la fosfatidilserina pero la membrana plasmática sigue intacta, a diferencia de la necrosis, donde es al principio de dicho proceso donde se pierde la integridad de la membrana <sup>(2, 6)</sup>. Por lo tanto, es necesario combinar la tinción de anexina V con algún colorante vital, que permita determinar la integridad de la membrana celular, para distinguir apoptosis y necrosis <sup>(6, 25)</sup>. Durante la apoptosis, hay una diferencia temporal entre la externalización de la fosfatidilserina y los cambios en la integridad de membrana, mientras que para la necrosis ambos eventos coinciden.

De todas formas, la citometría de flujo presenta la limitación de no poder distinguir entre células necróticas y apoptóticas tardías, ya que ambas son positivas para la tinción con anexina V y con el colorante vital <sup>(8)</sup>. Las características de la última etapa de la apoptosis, denominada necrosis secundaria, son las mismas que para la necrosis, por ejemplo hay pérdida de la integridad de membrana y hay liberación de proteínas al sobrenadante <sup>(2, 8, 9)</sup>. Por lo tanto, como la necrosis y apoptosis terminan con la externalización de la fosfatidilserina así como pérdida de la integridad de membrana, la necrosis y la apoptosis tardía no son distinguibles en un experimento de citometría de flujo con tinción con anexina V y un colorante vital <sup>(8, 9)</sup>. Por lo tanto, en estos experimentos se distinguen tres poblaciones: células viables (población doble negativa), células apoptóticas (población positiva para anexina V) y células necróticas (población doble positiva) <sup>(2, 6, 9)</sup>.

---

(2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Hawley, T. S. *et al.* (2018). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (25) Denecker, G. *et al.* (2000). Phosphatidylserine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and decrease in mitochondrial transmembrane potential. *FEBS Lett*, 465(1), 47-52.

La anexina V se encuentra disponible comercialmente conjugada a múltiples fluorocromos: FP488, sondas Alexa Fluor, ficoeritinas y carbocianinas, entre otros <sup>(2)</sup>. Como colorante vital también hay disponibles varios, como el 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o el PI <sup>(2, 6, 8, 9)</sup>. Si bien en la bibliografía normalmente es utilizado el PI, éste tiene un espectro de emisión amplio, lo cual es problemático si es usado en combinación con otros fluorocromos. Se pueden usar únicamente fluorocromos con un espectro de emisión que no se superpone o que se superpone muy poco. Si hay superposición, la misma se debe compensar en el análisis de datos <sup>(2)</sup>.

Además, es importante destacar que para algunas líneas celulares puede ocurrir que las células necróticas sean anexina V positivas aún no presentando pérdida de integridad de la membrana plasmática <sup>(26)</sup>. Entonces, en ese caso la doble tinción con anexina V y un colorante vital no sirve para discriminar apoptosis y necrosis y por eso se recomienda seguir más de un marcador.

#### **4.3 Resonancia magnética nuclear: principios y aplicaciones en la distinción entre apoptosis y necrosis**

La <sup>1</sup>H-RMN es una técnica versátil, dinámica, no invasiva y no destructiva que presenta aplicaciones tanto en el área química, el área biológica e incluso en la medicina <sup>(4, 27)</sup>. Se basa en las propiedades magnéticas de algunos núcleos: estudia las transiciones entre niveles de energía magnéticos de núcleos atómicos, transiciones que son estimuladas por ondas de radiofrecuencia <sup>(28, 29)</sup>. La <sup>1</sup>H-RMN consiste en una técnica de valor incalculable para elucidar moléculas de bajo peso molecular y que presenten gran libertad de movimiento.

---

<sup>(2)</sup> Krysko, D. V. *et al.* (2008). <sup>(4)</sup> Rainaldi, G. *et al.* (2008). <sup>(6)</sup> Vermes, I. *et al.* (1995). <sup>(8)</sup> Baskić, D. *et al.* (2006). <sup>(9)</sup> Hawley, T. S. *et al.* (2018). <sup>(26)</sup> Krysko, O. *et al.* (2004). Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis*, 9(4), 495-500. <sup>(27)</sup> Gerothanassis, I. P. *et al.* (2002). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine. *Chem Educ Res Pract*, 3(2), 229-252. <sup>(28)</sup> Thompson, S. N. (1990). NMR spectroscopy: its basis, biological application and use in studies of insect metabolism. *Insect Biochem*, 20(3), 223-237. <sup>(29)</sup> Elguero, J. *et al.* (2013). Resonancia magnética nuclear de protón: Aplicaciones en Química Orgánica. Libro disponible en [http://are.igim.csic.es/cursos/rmn\\_parte1.pdf](http://are.igim.csic.es/cursos/rmn_parte1.pdf)

Dentro de sus diversas aplicaciones, es extremadamente útil para obtener información acerca del estado metabólico, el estado bioenergético e información estructural de células y tejidos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (4, 30). En particular, ha sido utilizada para caracterizar células cancerosas y normales de tejidos humanos así como también se han identificado señales asociadas con la apoptosis y la necrosis, lo que permite estudiar el tipo de mecanismo de muerte mediante la adquisición del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de suspensiones celulares (4, 10-13, 15, 17-20, 24, 30).

Además de la  $^1\text{H}$ -RMN, otras técnicas de resonancia magnética nuclear han sido aplicadas al estudio del proceso de muerte celular. En particular, la  $^{31}\text{P}$ -RMN y la  $^{13}\text{C}$ -RMN han sido utilizadas para estudiar la apoptosis (11, 12, 14, 15, 17, 21, 31, 32). Sin embargo, tales técnicas presentan desventajas respecto a la  $^1\text{H}$ -RMN:

- Debido a la baja abundancia isotópica del  $^{13}\text{C}$ , así como a su menor momento magnético comparado con el  $^1\text{H}$ , los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN presentan una baja relación señal/ruido, dado que las señales no son tan intensas y además se requieren tiempos de adquisición mayores comparado con  $^1\text{H}$ -RMN (11, 27).
- En el caso del  $^{31}\text{P}$ , si bien presenta una abundancia isotópica de 100 %, debido a que presenta un menor momento magnético comparado con el  $^1\text{H}$ , esto hace que el  $^{31}\text{P}$  sea menos sensible a experimentos de RMN comparado con el  $^1\text{H}$ , lo que resulta en espectros con menor relación señal/ruido (11, 27).

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (14) Ronen, S. M. *et al.* (1999). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M., *et al.* (2005). (21) Lutz, N. W. *et al.* (2003). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (27) Gerothanassis, I. P. *et al.* (2002). (30) Barba, I. *et al.* (1999). The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res*, 59(8), 1861-1868. (31) Engelmann, J. *et al.* (1996) Early stage monitoring of mitofosine induced apoptosis in KB cells by multinuclear NMR spectroscopy. *Anticancer Res*, 16(3B), 1429-1439. (32) Bogin, L. *et al.* (1998). TNF-induced modulations of phospholipid metabolism in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1392(2-3), 217-232.

- De forma adicional, está descrito que los cambios en el espectro de  $^{31}\text{P}$ -RMN asociados a un proceso apoptótico parecerían ser específicos de cada línea celular <sup>(11)</sup>, mientras que hay ciertos cambios en el  $^1\text{H}$ -RMN asociados a la apoptosis que serían independientes de la línea celular, lo que hace de ella una técnica más robusta y aplicable al estudio de la apoptosis <sup>(4, 10-13, 15-20, 24, 30)</sup>.

Por todo lo anterior, la  $^1\text{H}$ -RMN ha sido la técnica más ampliamente utilizada para estudios del tipo de mecanismo de muerte celular. Mediante el uso de la técnica  $^1\text{H}$ -RMN es posible estudiar el tipo de mecanismo de muerte celular siguiendo señales específicas en el espectro de RMN de protón, las cuales se relacionan de forma directa a las diferencias moleculares que existen entre los diferentes tipos de muerte celular que la célula puede experimentar <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>. Más allá que la  $^1\text{H}$ -RMN representa una técnica alternativa mediante la cual es posible estudiar el tipo de mecanismo de muerte celular *in vitro*, la mayor aplicabilidad de dicha técnica representa su aplicación *in vivo*, la  $^1\text{H}$ -MRS (en inglés *Magnetic Resonance Spectroscopy*), donde existe la potencialidad de seguir la respuesta al tratamiento de un tumor siguiendo las señales asociada a la apoptosis y necrosis, así como aquellas asociadas al estado proliferativo de las células <sup>(10, 12, 14, 15, 18, 30, 33-36)</sup>.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (14) Ronen, S. M. *et al.* (1999). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (16) Hakumäki, J. M. *et al.* (2000). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (30) Barba, I. *et al.* (1999). (33) Kumar, M. *et al.* (2015). Magnetic resonance spectroscopy for detection of choline kinase inhibition in the treatment of brain tumors. *Mol Cancer Ther*, 14(4), 899-908. (34) Hakumäki, J. M. *et al.* (1999).  $^1\text{H}$ -MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: Implications for the *in vivo* detection of apoptosis. *Nat Med*, 5(11), 1323. (35) Lindskog, M. *et al.* (2005). Proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma: current status, prospects and limitations. *Cancer Lett*, 228(1-2), 247-255. (36) Aboagye, E. O. *et al.* (1998). Detection of tumor response to chemotherapy by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy: effect of 5-fluorouracil on lactate levels in radiation-induced fibrosarcoma 1 tumors. *Cancer Res*, 58(5), 1063-1067.

#### 4.3.1 $^1\text{H}$ -RMN de suspensiones celulares: señales asociadas a la muerte celular

De acuerdo a lo anteriormente establecido, mediante el análisis del espectro de resonancia magnética nuclear de protón obtenido de suspensiones de células sufriendo un proceso apoptótico o necrótico se pueden evidenciar cambios metabólicos y bioquímicos asociados a cada proceso <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>. Por lo tanto, siguiendo aquellas señales asociadas a la apoptosis o la necrosis, se puede determinar el tipo de mecanismo de muerte que está sufriendo la suspensión de células.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de suspensiones celulares se distinguen varias señales asociadas a la membrana celular. Por un lado se distinguen un grupo de señales correspondientes a los denominados lípidos móviles: consisten en las cadenas de ácidos grasos esterificados, triglicéridos de membrana, con una menor contribución de ácidos grasos libres y ésteres de colesterol. Debido a que para ser detectada una señal en el espectro de RMN de protón la molécula no debe presentar mayores restricciones en su movimiento, se proponen dos fuentes alternativas de estos lípidos móviles a nivel *in vitro*: o bien que sean triglicéridos que forman parte de microdominios globulares o que sean lípidos que forman parte de los cuerpos lipídicos intracelulares <sup>(16, 23, 30, 37, 38)</sup>. En muchos procesos celulares, como por ejemplo la proliferación, la apoptosis y la necrosis, se han observado cambios a nivel de estas señales correspondientes a los lípidos móviles. Estos lípidos móviles generan señales en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN donde dos son de relevancia: una correspondiente a los grupos metilos, con un desplazamiento químico en el entorno de las 0.9 ppm, y la segunda que se corresponde con los metilenos de estos lípidos, señal que se observa en el entorno de 1.3 ppm <sup>(4, 10-13, 15-20, 24, 30)</sup>.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (16) Hakumäki, J. M. *et al.* (2000). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (23) Di Vito, M. *et al.* (2001). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (30) Barba, I. *et al.* (1999). (37) Iorio, E. *et al.* (2003). Triacsin C inhibits the formation of  $^1\text{H}$ -NMR-visible mobile lipids and lipid bodies in HuT 78 apoptotic cells. *Bioch Biophys Acta*, 1634(1-2), 1-14. (38) Brisdelli, F. *et al.* (2003). Two-step formation of  $^1\text{H}$ -NMR visible mobile lipids during apoptosis of paclitaxel-treated K562 cells. *Biochem Pharmacol*, 65(8), 1271-1280.

Por otro lado, en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, se distinguen un grupo de señales relacionados con la colina, a saber: por un lado la colina en sí y la fosfocolina y por otro la glicerofosfocolina, señales observadas en 3.2 y 3.22 ppm, respectivamente. Se han descrito cambios en este grupo de señales también asociados con la muerte celular, aunque existe cierta discrepancia respecto al tipo de mecanismo de muerte y los cambios espectroscópicos que estén asociados a los mismos y si tales cambios son indiferentes de la línea celular y del tipo de muerte <sup>(4, 10-12, 15, 17, 19, 20, 24)</sup>.

Además, también se han descrito otras señales que permitirían diferenciar entre apoptosis y necrosis, como por ejemplo la glutamina y glutamato, las cuales constituyen el grupo de señales observadas entre 2.04 y 2.34 ppm, la taurina, observada entre 3.25 y 3.41 ppm así como también el ácido láctico adsorbido a la membrana plasmática, correspondiente a la señal observada en 1.33 ppm <sup>(4, 12)</sup>. Sin embargo, al igual que sucede con la colina, no hay consenso absoluto acerca del comportamiento de tales señales en los diferentes mecanismos de muerte <sup>(4, 12)</sup>.

#### 4.3.2 Señales asociadas a la apoptosis: consensos y controversias

De forma generalizada, para diferentes líneas celulares, se ha observado un aumento en la intensidad de la señal correspondiente a los metilenos de los lípidos móviles cuando una suspensión celular está transitando un proceso apoptótico <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup> (Figura 3). Sin embargo, respecto a lo que sucede con la señal correspondiente a los metilos de los lípidos móviles, no existe un consenso tan claro, existiendo bibliografía donde se describe un aumento de dicha señal con el proceso apoptótico <sup>(4, 11, 13, 17-19)</sup> así como también hay descripciones de la ausencia de cambio en dicha señal <sup>(12, 20)</sup>.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997).

Por otro lado, si bien se encuentra establecido que existe una correlación entre el aumento de la señal de los metilenos de los lípidos móviles con la apoptosis, se han descrito varias formas de cuantificar el aumento en dicha señal:

- hay autores que realizan un cociente entre la integración de las señales de los metilenos y los metilos de los lípidos móviles, medida que comparan con la obtenida para una condición control <sup>(10, 12, 19)</sup>.
- hay autores que comparan la altura de las señales de los lípidos móviles entre la muestra problema y una condición control <sup>(11)</sup>.
- hay autores que integran la señal de los lípidos móviles, referenciada respecto a alguna otra señal que se ve invariante entre los espectros de las muestras y el control, y analizan directamente el área correspondiente a la señal de los metilenos de los lípidos móviles <sup>(13, 38)</sup>.
- hay autores que obtienen el área de la señal de los lípidos móviles mediante algoritmos matemáticos, las cuales corrigen respecto a la condición control y calculan cocientes o porcentajes de variación respecto a la condición control <sup>(4, 17, 18, 20)</sup>.

De forma adicional, tampoco existe un común acuerdo acerca de la señal identificada como los metilenos de los lípidos móviles: si bien siempre comprende el análisis de la señal con desplazamiento químico centrado en 1.30 ppm, hay autores que en el análisis toman en cuenta a la señal correspondiente al metilo del ácido láctico, que aparece en 1.33 ppm <sup>(12, 17, 18)</sup>, así como también hay quienes toman en cuenta un triplete en 1.1 ppm, correspondiente al metileno del etanol adsorbido a la membrana plasmática <sup>(13)</sup>.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (38) Brisdelli, F. *et al.* (2003).

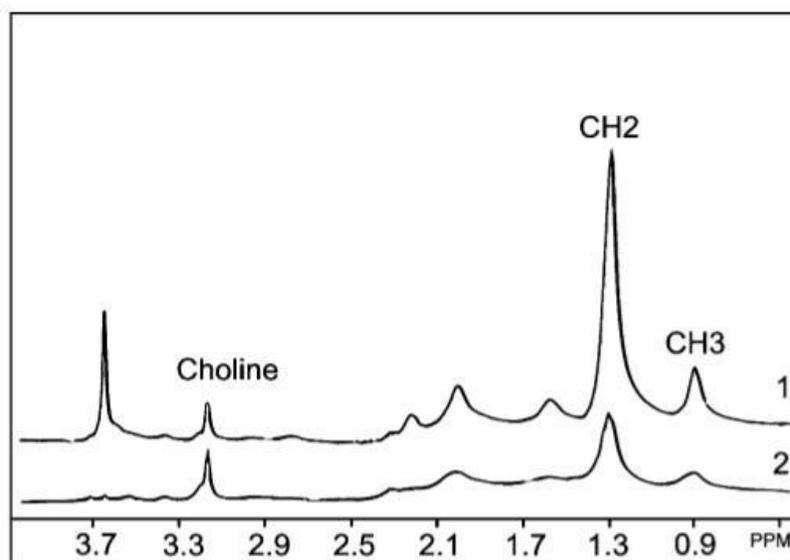
Por otro lado, el comportamiento de la colina, y sus metabolitos relacionados, ha sido extensamente estudiado en relación a la apoptosis <sup>(4, 10-12, 15, 17, 19, 20, 24)</sup>. En general, en la bibliografía se describe una correlación entre la disminución de la colina y la fosfocolina asociado a la apoptosis <sup>(4, 10-12, 19, 20, 24)</sup> (*Figura 3*). De forma similar a lo que sucede con el análisis de las señales de los metilenos de los lípidos móviles, los cambios en las señales de los metabolitos relacionados con colina han sido estudiados de diversas maneras:

- hay autores que integran las señales y las referencian respecto a alguna otra señal que se ve mantiene invariante entre los espectros de las muestras y el control, y analizan directamente el área correspondiente a las señales de los metabolitos relacionados con colina <sup>(10, 12, 19)</sup>.
- hay autores que comparan la intensidad de las señales de los metabolitos relacionados con colina entre la muestra problema y una condición control <sup>(11)</sup>.
- hay autores que obtienen el área de las señales de los metabolitos relacionados con colina mediante algoritmos matemáticos, las cuales corrigen respecto a la condición control y calculan porcentajes de variación respecto a la condición control <sup>(4, 20)</sup>.

Respecto a los otros metabolitos cuyo comportamiento ha sido estudiado en relación a los procesos de muerte celular sucede algo similar a lo descrito para la señal correspondiente a los metilos de los lípidos móviles. Para el glutamato y la glutamina hay descripciones acerca de su disminución en células apoptóticas <sup>(4)</sup>, así como también hay descripciones que en dichos metabolitos no hay mayores cambios durante el proceso apoptótico <sup>(11)</sup>. Lo mismo sucede con el ácido láctico, donde se ha descrito su aumento <sup>(4, 21)</sup> pero también su disminución <sup>(22, 36, 39)</sup> asociado con la apoptosis. Por esto último, ha sido planteado que no sería conveniente, en general y en particular en el marco de esta tesina, el estudio del ácido láctico como un marcador específico de cierto mecanismo de muerte, debido a que las descripciones varían según el estímulo utilizado –radiación, calor, tratamiento con un compuesto-, así como la línea celular utilizada <sup>(4, 21, 22, 36, 39)</sup>.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (21) Lutz, N. W. *et al.* (2003). (22) Nunn, A. V. *et al.* (1996). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (36) Aboagye, E. O. *et al.* (1998). (39) Adebodun, F. *et al.* (1994). <sup>31</sup>P NMR characterization of cellular metabolism during dexamethasone induced apoptosis in human leukemic cell lines. *J Cell Physiol*, 158(1), 180-186.



**Figura 3:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) de células MT4, una línea tumoral linfoide, en dos condiciones: en **(1)** las células fueron tratadas con etopósido ( $10\ \mu\text{M}$ ) por 18 horas, induciendo apoptosis en tales células y el espectro **(2)** corresponde al control sin tratar. Imagen extraída de ref. [\(20\)](#) *Mikhailenko, V. M. et al. (2005)*.

#### 4.3.3 Señales asociadas a la necrosis: consensos y controversias

En cuanto a los cambios en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN asociados a la necrosis, no hay ninguna señal cuyo cambio haya sido relacionado de forma inequívoca con este proceso de muerte celular. Más aún, incluso hay descripciones que indican que no hay cambios en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN asociados a este mecanismo de muerte, obteniéndose espectros iguales que la condición control para muestras que tienen células necróticas <sup>(11)</sup>.

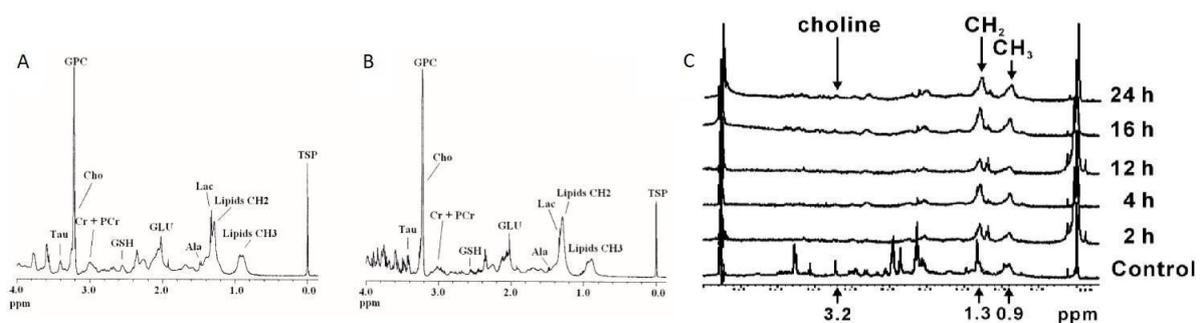
Respecto a los lípidos móviles, por un lado, hay descripciones que indican que el comportamiento de los metilenos de los lípidos móviles permanecen invariados frente a un proceso necrótico mientras que se observa un aumento en la señal de los metilos de tales lípidos <sup>(4, 12)</sup> ([Figura 4, parte A y B](#)). Por otro lado, se describe que hay un aumento en el cociente entre la integración de las señales de los metilenos y metilos de los lípidos móviles, algo similar a lo que sucede con la apoptosis, pero que el aumento sería menor y que si se estudiara en función del tiempo, dicho aumento alcanzaría un plateau <sup>(10)</sup> ([Figura 4, parte C](#)). A su vez, también hay descripciones indicando que dicho cociente permanece invariado en células necróticas <sup>(20)</sup>.

---

[\(4\)](#) Rainaldi, G. *et al.* (2008). [\(10\)](#) Shih, C. *et al.* (2005). [\(11\)](#) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). [\(12\)](#) Bezabeh, T. *et al.* (2001). [\(20\)](#) *Mikhailenko, V. M. et al. (2005)*.

En cuanto a los metabolitos relacionados con colina, hay descripciones más contradictorias. Ciertos autores establecen que asociado con la necrosis se observaría un aumento en todos los metabolitos vinculados a colina <sup>(4)</sup> (*Figura 4-A y B*), mientras que otros establecen que en la necrosis las señales de tales metabolitos desaparecen por completo <sup>(10, 12)</sup> (*Figura 4-C*).

Igualmente, para el glutamato y la glutamina: hay descripciones de sus aumentos asociados con la necrosis <sup>(4)</sup>, como también hay descripciones que indican que tales señales desaparecen en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de células necróticas <sup>(12)</sup>.



**Figura 4:** Algunos de los cambios en el espectro <sup>1</sup>H-RMN descriptos por estar asociados con la muerte celular por necrosis. **A.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz) de células HL60 expuestas a 57 °C por 15 minutos. **B.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (600 MHz) de la muestra control de células HL60. A y B de esta figura fueron extraídas de la ref <sup>(4)</sup> Rainaldi, G. et al (2008). **C.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz) de células MRC-5 tratadas con HgCl<sub>2</sub> por 0, 2, 4, 12, 16 y 24 horas. Extraída de la ref <sup>(10)</sup> Shih, C. et al (2005).

<sup>(4)</sup> Rainaldi, G. et al. (2008). <sup>(10)</sup> Shih, C. et al. (2005). <sup>(12)</sup> Bezabeh, T. et al. (2001).

#### 4.3.4 Criterios definidos para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular de un cultivo celular por <sup>1</sup>H-RMN

A modo de resumen de las secciones anteriores, se podría afirmar que en la bibliografía hay cierto consenso acerca del aumento en la intensidad de la señal de los metilenos de los lípidos móviles y su asociación con la puesta en marcha de un proceso apoptótico en una suspensión de células *in vitro* <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>. Para la necrosis no hay un claro consenso acerca del comportamiento de esas señales. Sin embargo, las descripciones indican que o bien no hay cambios en la señal de los metilenos de los lípidos móviles <sup>(4, 12, 20)</sup> o hay un sutil aumento <sup>(10)</sup>. Por lo tanto, se puede establecer, como una primera aproximación, que si se observa un gran aumento en la integración de dicha señal, esto sería indicativo de apoptosis, y si se observa otro comportamiento distinto del anterior, sería indicativo de necrosis.

Por otro lado, el comportamiento de los metabolitos de la colina es otro marcador que ha sido extensamente estudiado en análisis donde se pretende diferenciar apoptosis y necrosis mediante <sup>1</sup>H-RMN. Sin embargo, su seguimiento como marcador para diferenciar estos mecanismos de muerte se vuelve complicado debido a la controversia hallada en la bibliografía: si bien habría cierto consenso en que una pequeña disminución en la integración de estas señales está asociado a la apoptosis <sup>(4, 10-12, 19, 20, 24)</sup>, para la necrosis hay descripciones de aumento <sup>(4)</sup> o de abolición de estas señales <sup>(10, 12)</sup>. Por lo tanto, de forma aproximada, se podría establecer que si se observa una pequeña disminución de estas señales, esto sería indicativo de apoptosis, quedando nuevamente la determinación de la necrosis por la negativa.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997).

Finalmente, se ha observado un aumento de taurina relacionado con la necrosis, lo que permitiría relacionar de forma inequívoca dicha señal con necrosis para diferenciarla de la apoptosis, debido a que en células apoptóticas se observa una disminución de tal señal <sup>(4)</sup>. Esto permitiría definir a la necrosis más allá de la ausencia de señales apoptóticas en el <sup>1</sup>H-RMN. Sin embargo, debido a que dicha descripción ha sido establecida para un única línea celular particular, HL-60, no hay suficiente información disponible acerca de cuán generalizable es este proceso.

Más allá de la falta de un claro establecimiento de un cierto número de marcadores apoptóticos y necróticos en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN, no hay descripciones acerca de estudios anteriores del tipo de mecanismo de muerte celular por <sup>1</sup>H-RMN en líneas celulares de glioma, en particular de glioblastoma multiforme, como la línea celular U87 MG. Esto añade otro nivel de complejidad al análisis de los resultados de <sup>1</sup>H-RMN, debido a que existe la posibilidad que aquellos patrones anteriormente descritos para otras líneas celulares no se correlacionen para el caso de la línea U87 MG.

Por otro lado, en la bibliografía se ha planteado que la relevancia de estos trabajos donde se estudia el tipo de mecanismo de muerte celular por <sup>1</sup>H-RMN permitiría la definición de patrones apoptóticos y necróticos en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN, lo que es de gran importancia para una posible aplicación en estudios de MRS para el seguimiento del estado de tumores *in vivo* frente a tratamientos <sup>(10, 12, 14, 15, 18, 30, 33-36)</sup>.

Por todo lo anteriormente expuesto, el hecho que el trabajo propuesto para esta tesina de grado pretenda hacer lo propio sobre una línea de glioma le añade interés, dado que el seguimiento del estado del tumor por MRS de tumores cerebrales representa una alternativa interesante debido a las características no invasivas de la técnica.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (14) Ronen, S. M. *et al.* (1999). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (30) Barba, I. *et al.* (1999). (33) Kumar, M. *et al.* (2015). (34) Hakumäki, J. M. *et al.* (1999). (35) Lindskog, M. *et al.* (2005). (36) Aboagye, E. O. *et al.* (1998).

#### **4.4 Glioblastoma multiforme (GBM)**

##### **4.4.1 Generalidades**

Los gliomas son el grupo más común de tumores primarios de cerebro, incluyendo astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas. Dentro de los gliomas, categorizando en el grado IV se encuentra el glioblastoma multiforme, el cual constituye aproximadamente el 54.4 % de todos los gliomas malignos y siendo, por lo tanto, el más común tumor primario de cerebro así como el más maligno <sup>(33, 40-45)</sup>.

Los GBM se desarrollan a partir de células de la glía, caracterizándose por presentar ciertas características histopatológicas: hiper celularidad, necrosis, pleomorfismo, y proliferación vascular <sup>(42)</sup>. GBM se trata de un tumor de alta capacidad de infiltración y como consecuencia es difícil de tratar: en el 95 % de los casos el tumor es recurrente, en un radio de 2 cm de donde se encontraba el tumor original <sup>(33, 40-42, 44, 46)</sup>. Sumado a lo invasivo que es este tumor, también presenta una gran vascularización y por lo general es resistente a radioterapia y quimioterapia <sup>(42, 43, 46)</sup>.

Un aspecto importante de la patogénesis de los gliomas es que su malignización depende de la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores y de la acumulación secuencial de alteraciones genéticas <sup>(40-43, 47)</sup>.

---

(33) Kumar, M. *et al.* (2015). (40) Alifieris, C. *et al.* (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther*, 152, 63-82. (41) Patel, M. *et al.* (2012). Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. *Expert Opin Inv Drug*, 21(9), 1247-1266. (42) Polivka, J. *et al.* (2012). New molecularly targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Anticancer Res*, 32(7), 2935-2946. (43) Minniti, G. *et al.* (2009). Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res*, 29(12), 5171-5184. (44) Chamberlain, M. (2011). Evolving strategies: future treatment of glioblastoma. *Expert Rev Neurother*, 11(4), 519-532. (45) Louis, D. N. *et al.* (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*, 131(6), 803-820. (46) Wen, P. Y. *et al.* (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5), 492-507. (47) Sasmita, A. O. *et al.* (2018). Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia Pac J Clin Oncol*, 14(1), 40-51.

Entre las alteraciones genéticas descritas para gliomas malignos se encuentran la presencia de una copia extra del cromosoma 7 así como la amplificación del gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) <sup>(40, 42)</sup>. Además de las alteraciones genéticas, modificaciones epigenéticas como el estado de metilación del ADN y cambios a nivel de la cromatina también tienen un efecto en la regulación de la expresión genética en gliomas <sup>(42)</sup>. Todas estas alteraciones llevan a una sobreexpresión de factores de crecimiento, a la desregulación de muchas vías de señalización así como a la alteración de reacciones bioquímicas <sup>(41-43, 47)</sup>. Entre las vías de señalización que se encuentran involucradas en la patogénesis de GBM se encuentran: la vía RAS y PI3K-Akt, la vía p53, y las vías metabólicas en las que participan las enzimas isocitrato deshidrogenasas IDH1 e IDH2 <sup>(42)</sup>. Como consecuencia, estas modificaciones determinan un aumento en la proliferación celular mediado por procesos de angiogénesis, resistencia a la apoptosis y un aumento en la reparación del ADN <sup>(41)</sup>.

De acuerdo a las características anteriormente descritas, se define la existencia de dos tipos de GBM indistinguibles desde el punto de vista histopatológico: por un lado están los GBM primarios o IDH-wildtype, los cuales comprenden entre el 90 y 95 % de los casos totales, mientras que por otro lado están los GBM secundarios o IDH-mutantes. Los GBM primarios son más comunes en hombres que en mujeres, y se desarrollan por lo general en individuos mayores de 55 años, de forma de novo y se caracterizan por presentar amplificación y mutación del EGFR en el 35 % de los casos y tener mutaciones en el gen PTEN en el 24 % de los casos (del inglés, phosphatase and tensin homologue on chromosome 10). Los GBM secundarios se desarrollan en individuos más jóvenes, en igual medida en hombres y mujeres, y se desarrollan en personas que ya han presentado gliomas difusos de menor grado. Mutaciones en p53 es una característica de los GBM secundarios, presentándose en el 81 % de los casos, así como también presentan una sobreexpresión del factor alfa de crecimiento plaquetario (PDGF- $\alpha$ , del inglés *platelet-derived growth factor  $\alpha$* ) y su receptor PDGFR- $\alpha$  (del inglés *platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$* ) <sup>(40-42, 45, 47)</sup>.

---

(40) Alifieris, C. *et al.* (2015). (41) Patel, M. *et al.* (2012). (42) Polivka, J. *et al.* (2012). (43) Minniti, G. *et al.* (2009). (45) Louis, D. N. *et al.* (2016). (47) Sasmita, A. O. *et al.* (2018).

A su vez, las características moleculares encontradas para GBM, permiten definir varios marcadores moleculares de GBM, con los cuales se puede predecir el resultado de un dado tratamiento. Entre ellos se encuentran: mutaciones en las enzimas IDH1 e IDH2, el fenotipo de metilación en las islas CpG y el estado de metilación del promotor del gen MGMT ( $O^6$ -metilguanina metiltransferasa). Aquellos pacientes que presentan GBM con mutaciones en las enzimas IDH1 e IDH2 parecen tener una mejor prognosis, así como aquellos pacientes que presentan GBM donde el estado de metilación del promotor del gen MGMT es alto presentan una mejor respuesta frente a las terapias actualmente utilizadas <sup>(42)</sup>. Dentro de los modelos *in vitro* de glioblastoma multiforme, se encuentra la línea celular U87 MG, la cual presenta sobreexpresión de EGFR <sup>(5)</sup> (Figura 5).

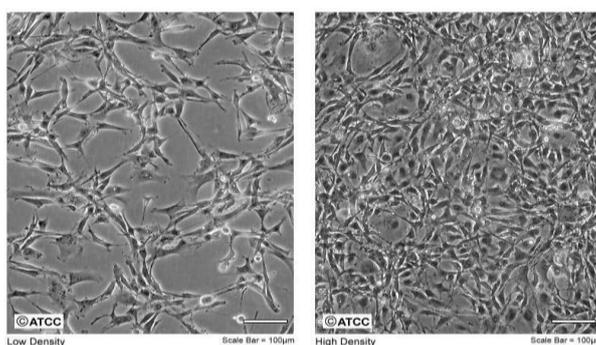


Figura 5. Células U87 MG, un modelo *in vitro* de la enfermedad glioblastoma multiforme. La imagen de la izquierda representa un cultivo en baja confluencia (50%), mientras que la imagen de la derecha representa un cultivo en elevada confluencia (100%). La barra se corresponde con 100  $\mu$ m en ambas imágenes. La imagen fue obtenida de la página [www.atcc.org](https://www.atcc.org/products/all/HTB-14.aspx#characteristics) (<https://www.atcc.org/products/all/HTB-14.aspx#characteristics>).

#### 4.4.2 Tratamiento

Actualmente, el tratamiento convencional para GBM consiste en la máxima resección quirúrgica posible, junto con radioterapia y quimioterapia, debido a que el GBM normalmente infiltra el tejido cercano y no es posible removerlo del todo mediante cirugía <sup>(5, 33, 40-44, 47)</sup>. Respecto a la quimioterapia para el tratamiento de GBM, el fármaco de referencia es el agente alquilante TMZ, el cual es capaz de metilar las posiciones  $N^7$  ó  $O^6$  de la guanina, generando entrecruzamientos entre hebras del ADN <sup>(40-44, 47)</sup>.

---

(5) Eimer, S. *et al.* (2011). (33) Kumar, M. *et al.* (2015). (40) Alifieris, C. *et al.* (2015). (41) Patel, M. *et al.* (2012). (42) Polivka, J. *et al.* (2012). (43) Minniti, G. *et al.* (2009). (44) Chamberlain, M. (2011). (47) Sasmita, A. O. *et al.* (2018).

Dicho tratamiento consiste de un tratamiento paliativo, el cual presenta limitada efectividad: la supervivencia media de los pacientes diagnosticados con GBM se encuentra entre 12.1 y 14.6 meses y sólo entre 3 % y 5 % de los pacientes sobreviven más de tres años <sup>(42, 43)</sup>.

Además, la respuesta a este tratamiento de un paciente depende de cuán metilado se encuentre el promotor MGMT. Este gen codifica para la enzima MGMT, la cual es capaz de reparar los daños en el ADN introducidos por el TMZ. El nivel de metilación del promotor de dicho gen repercute en el nivel de expresión de la enzima: promotores que se encuentren mayormente metilados se asocian con el silenciamiento génico de MGMT y por ende una menor expresión de la enzima MGMT. Por lo tanto, aquellos pacientes que tengan metilado dicho promotor responderán mejor al tratamiento convencional, ya que la enzima MGMT se encontrará expresada en menor medida y por lo tanto, no será capaz de reparar la mayor parte de los daños al ADN introducidos por el TMZ. Como únicamente el 30 % de los pacientes con GBM presentan metilado el promotor de MGMT, el tratamiento convencional disponible resulta efectivo solo para este grupo de pacientes <sup>(42-44)</sup>. De forma adicional, debido a la característica invasiva de GBM, por lo general el tumor es recurrente <sup>(33, 40, 42, 44, 46)</sup>. Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de investigar en otras posibles terapias para el tratamiento de esta enfermedad <sup>(5, 33, 40-44, 46, 47)</sup>.

Los avances en el entendimiento de la patogénesis molecular de GBM sugirieron una diana molecular más racional: los receptores con actividad tirosina quinasas, entre ellos EGFR, PDGFR y VEGFR por su rol en la patogénesis de la enfermedad <sup>(5, 40-43, 48)</sup>. Cerca de 90 % de los casos de GBM presentan mutaciones en estos receptores, o en sus efectores, corriente abajo en la vía de señalización, lo que los hace una diana molecular clave para el desarrollo de terapias antitumorales contra ellos <sup>(41-43, 48)</sup>.

---

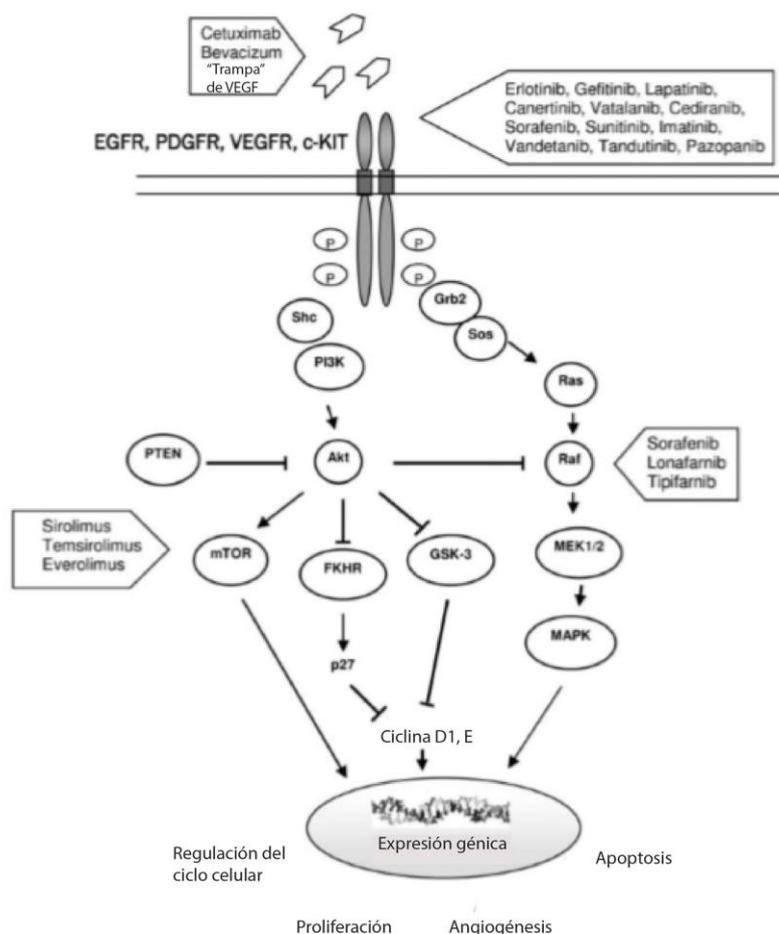
(5) Eimer, S. *et al.* (2011). (33) Kumar, M. *et al.* (2015). (40) Alifieris, C. *et al.* (2015). (41) Patel, M. *et al.* (2012). (42) Polivka, J. *et al.* (2012). (43) Minniti, G. *et al.* (2009). (44) Chamberlain, M. (2011). (46) Wen, P. Y. *et al.* (2008). (47) Sasmita, A. O. *et al.* (2018). (48). Arora, A. *et al.* (2005). Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(3), 971-979.

Por un lado, como se nombra antes en la introducción, en la gran mayoría de los casos de GBM el gen que codifica para EGFR se encuentra amplificado y mutado <sup>(40, 42, 43)</sup>. En primer lugar, la sobreexpresión del receptor se asocia con una peor respuesta frente al tratamiento convencional, así como con una recurrencia del tumor más temprana. En segundo lugar, la forma mutada EGFR vIII representa una forma truncada del receptor, el cual se activa de forma constitutiva <sup>(41-43)</sup>. Como la activación del EGFR colabora con la patogénesis de GBM, al estimular la gliomagénesis, se asocia con una peor prognosis y menor supervivencia del paciente <sup>(41, 43)</sup>.

Por otro lado, el PDGFR se encuentra comúnmente sobreactivado en el 30 % de los casos de GBM <sup>(40, 42, 43)</sup>. El PDGF y sus receptores promueve el crecimiento tumoral de forma autócrina, así como promueve la angiogénesis de forma parácrina en células endoteliales adyacentes <sup>(41, 42)</sup>. La angiogénesis es también promovida por VEGF en sus isoformas A a D, en particular a través de la señalización vía VEGFR2. Una extensiva proliferación microvascular se encuentra asociada con una baja supervivencia y un aumento en el riesgo de recurrencia del tumor <sup>(42)</sup>. Esto hace que tanto el VEGFR2 así como el PDGFR sean atractivas dianas moleculares <sup>(41, 44)</sup>.

---

(40) Alifieris, C. *et al.* (2015). (41) Patel, M. *et al.* (2012). (42) Polivka, J. *et al.* (2012). (43) Minniti, G. *et al.* (2009). (44) Chamberlain, M. (2011).

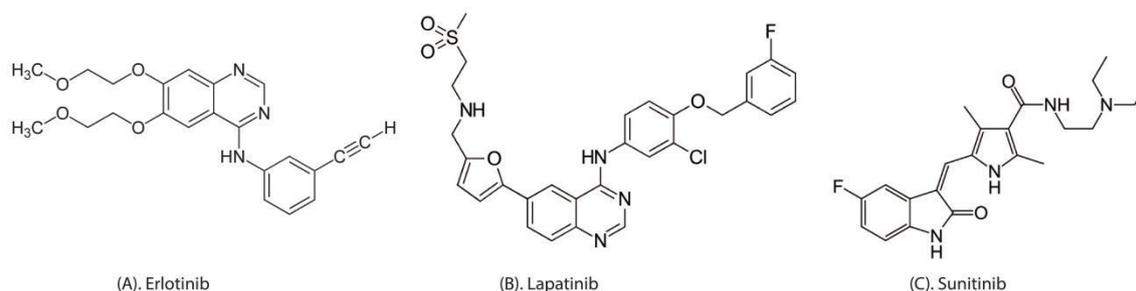


**Figura 6.** Vías de señalización aberrantes involucradas en la patogénesis de GBM. Los receptores EGFR, PDGFR y VEGFR se encuentran involucrados en cascadas de señalización que promueven la proliferación celular, la angiogénesis, así como la migración, la supervivencia y diferenciación de células tumorales. Imagen extraída y modificada de ref. (43) Minniti, G. et al. (2009).

Por lo tanto, debido al evidente rol del EGFR, PDGFR (tanto  $\alpha$  como  $\beta$ ) y el VEGFR2 en la patogénesis de GBM, las estrategias de tratamiento dirigidas a dichos blancos moleculares consisten en una estrategia racional de tratamiento anti GBM. Dentro de tales estrategias, se encuentran los inhibidores de tirosina quinasa (TKIs, del inglés *tyrosine kinase inhibitors*), los cuales actúan como potenciales inhibidores de la transducción de señales vía receptores de crecimiento y de la angiogénesis (41-44, 48). Actúan como inhibidores, al unirse de forma reversible al sitio de unión de ATP e inhibir la autofosforilación del receptor (41, 48). Existen pequeñas moléculas que permanecen activos por vía oral y que pueden ser combinadas con otras formas de quimioterapia y radioterapia (48).

(41) Patel, M. et al. (2012). (42) Polivka, J. et al. (2012). (43) Minniti, G. et al. (2009). (44) Chamberlain, M. (2011). (48) Arora, A., et al. (2005).

Erlotinib y lapatinib constituyen TKIs capaces de inhibir la actividad del EGFR <sup>(41)</sup> (*Figura 7*). En el caso de lapatinib, representa un TKI con una acción dual sobre el EGFR y el Her2 <sup>(40, 43)</sup>. Sunitinib representa un MTKI (del inglés, *multiple tyrosine kinase inhibitor*) con efecto sobre VEGFR 1 y 2, y PDGFR en sus dos variantes,  $\alpha$  y  $\beta$ , entre otros receptores (*Figura 7*) <sup>(40-43)</sup>.



*Figura 7.* Estructuras químicas de los fármacos erlotinib (A), lapatinib (B) y sunitinib (C). Los fármacos erlotinib y lapatinib constituyen inhibidores reversibles del EGFR, receptor que se encuentra sobreexpresado en muchos casos de GBM y estrechamente relacionado con la patogénesis de la enfermedad. El fármaco sunitinib constituye un inhibidor de múltiples tirosina quinasa, entre las cuales se encuentran los receptores PDGFR  $\alpha$  y  $\beta$ , así como el VEGFR en todas sus isoformas. Estos receptores también están involucrados en la patogénesis de GBM, participando en procesos como la estimulación de la proliferación del tumor así como la angiogénesis.

Si bien se han obtenido resultados preclínicos promisorios en líneas celulares modelo de GBM para erlotinib, en ensayos clínicos de diferentes fases el tratamiento con erlotinib no ha dado buenos resultados. Tanto utilizado como monoterapia, así como de forma adicional al tratamiento convencional, el tratamiento con erlotinib no resulta en un aumento de la supervivencia de los pacientes <sup>(41-43)</sup>. Algo similar sucede con lapatinib, donde en ensayos clínicos desarrollados no se ha observado eficacia del mismo como tratamiento del GBM <sup>(42)</sup>. De la misma manera, el tratamiento de GBM con sunitinib tampoco ha resultado en avances respecto a la terapia convencional tanto administrado como monoterapia o en combinación con radioterapia, a pesar de haber demostrado actividad antitumoral y anti-angiogénica en estudios preclínicos <sup>(41, 43)</sup>.

---

(40) Alifieris, C. *et al.* (2015). (41) Patel, M. *et al.* (2012). (42) Polivka, J. *et al.* (2012). (43) Minniti, G. *et al.* (2009).

Se ha propuesto que, de forma general, los malos resultados obtenidos para los TKIs en el tratamiento de GBM se deben a problemas en atravesar la barrera hematoencefálica y así acceder al tumor, así como el posible desarrollo de resistencia del tumor por selección de aquellas células que contienen mutaciones aún no descritas <sup>(41, 48)</sup>. A su vez, la diversidad y heterogeneidad inherente a la señalización del GBM puede estar sumándose a los hechos anteriores <sup>(42)</sup>. Es por esto que se ha adoptado como nueva estrategia la posibilidad de un tratamiento que consista en el uso de combinaciones de varios fármacos, de forma tal de atacar a más de un blanco molecular al mismo tiempo, lo que permitiría sobreponerse a la resistencia adquirida por los tumores, así como aumentar la eficacia terapéutica del tratamiento al inhibir múltiples vías redundantes <sup>(43, 48)</sup>. De momento, los TKIs representan tratamientos de segunda o tercera línea <sup>(48)</sup>.

Tanto el diagnóstico como la respuesta al tratamiento de GBM es seguido por varias técnicas, entre ellas MRI (del inglés *magnetic resonance imaging*) y resonancia magnética nuclear de protón (Figura 8) <sup>(46)</sup>.

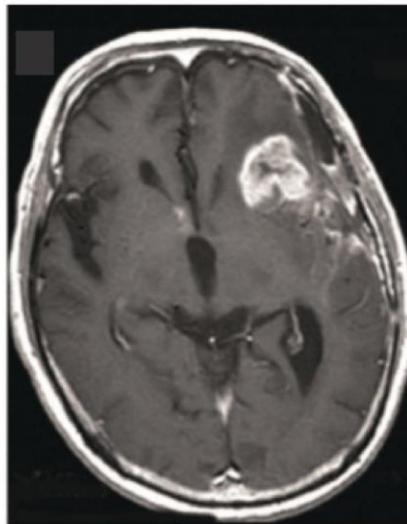


Figura 8. Imagen obtenida por la técnica MRI de un paciente con GBM. El tumor se puede observar como la masa blanca que se ve en la imagen, sobre la parte superior derecha de la misma. Imagen extraída de ref. <sup>(49)</sup> Miyatake, S. I., et al. (2016).

---

<sup>(41)</sup> Patel, M. et al. (2012). <sup>(42)</sup> Polivka, J. et al. (2012). <sup>(43)</sup> Minniti, G. et al. (2009). <sup>(46)</sup> Wen, P. Y. et al. (2008). <sup>(48)</sup> Arora, A. et al. (2005). <sup>(49)</sup> Miyatake, S. I. et al. (2016). Boron neutron capture therapy for malignant brain tumors. *Neurol Med Chir*, 56, 361-371.

#### 4.4.3 Terapia por captura neutrónica de boro (BNCT)

Otra estrategia de tratamiento que se plantea como alternativa a la terapia convencional para el tratamiento de gliomas de alto grado, y en particular GBM, es la BNCT. La misma permite la destrucción preferencial de las células tumorales mientras que las células normales del tejido permanecen intactas, incluso cuando ha ocurrido infiltración de las células tumorales en el tejido normal, siempre y cuando se dé una acumulación de boro selectiva en las células tumorales <sup>(46, 49, 50)</sup>.

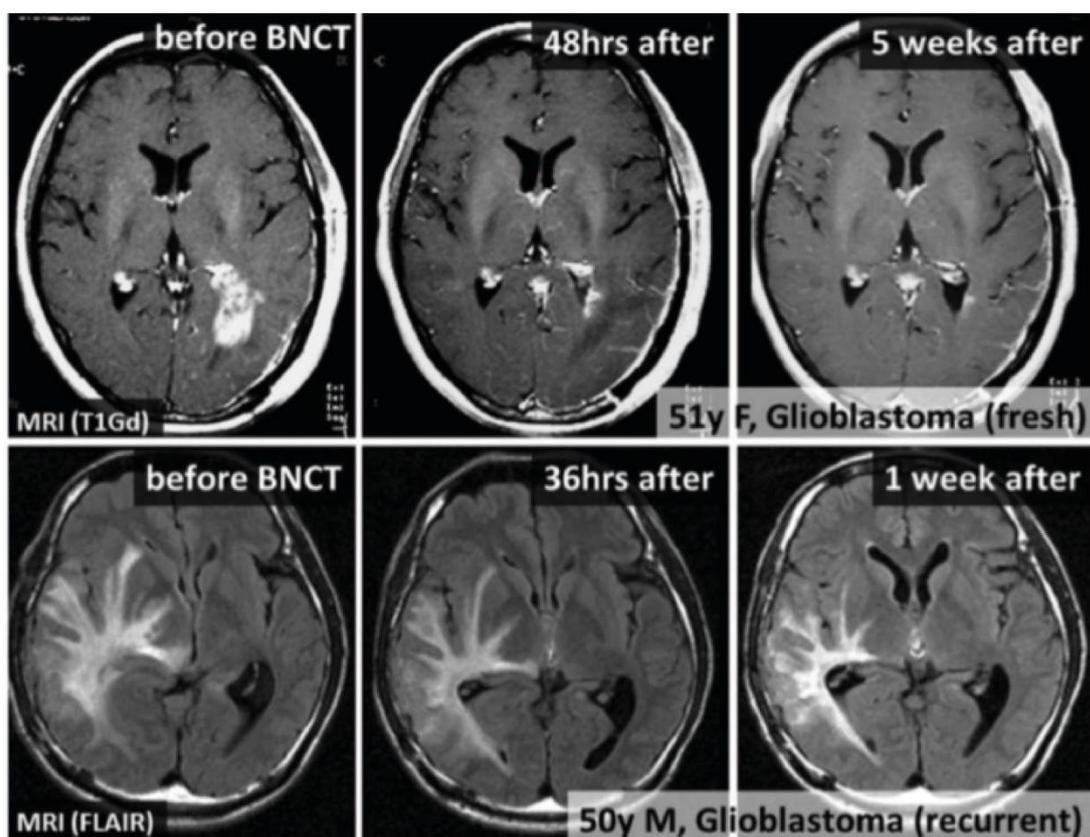
Dicha terapia se basa en la reacción nuclear entre el nucleido estable de boro  $^{10}\text{B}$  (un constituyente natural del elemento boro) y neutrones térmicos, donde ocurre la liberación de una partícula  $\alpha$  y un núcleo de  $^7\text{Li}$ , por cada núcleo de  $^{10}\text{B}$  <sup>(46, 49-51)</sup>. Debido a que el recorrido de estas partículas es limitado (entre 5 y 9 micras), los efectos destructivos de las mismas se encuentran limitados a las células que han acumulado este nucleido de boro <sup>(46, 49, 51)</sup>. En estudios clínicos, como agentes dadores de boro se utilizan *p*-boronofenilalanina (BPA) o sulfidrilborano (BSH) <sup>(46, 49, 50)</sup>. Para que la terapia BNCT resulte efectiva y selectiva, se debe acumular una cantidad suficiente de boro en células tumorales (alrededor de 20  $\mu\text{g}$  de  $^{10}\text{B}/\text{g}$  de tumor) y, al mismo tiempo, se debe acumular muy poca cantidad de boro en células normales <sup>(46, 49)</sup>. La selectividad en la acumulación de boro en células tumorales depende de la propia molécula que actúa como agente dador de boro <sup>(49)</sup>. A tales compuestos se les exige las siguientes características <sup>(46, 49, 51)</sup>:

1. poca toxicidad sistémica.
2. baja captación por células normales y alta captación por células tumorales, resultando en un radio óptimo de captación tejido tumoral/tejido normal mayor a 3.
3. alcanzar una concentración de 20  $\mu\text{g}$  de  $^{10}\text{B}/\text{g}$  en el tumor.
4. rápida eliminación de la sangre y de células normales, al mismo tiempo de tener una lenta eliminación de células tumorales durante la BNCT.
5. ser soluble y estable en agua.

---

(46) Wen, P. Y. *et al.* (2008). (49) Miyatake, S. I. *et al.* (2016). (50) Yamamoto, T. *et al.* (2008). Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Lett*, 262(2), 143-152. (51) Barth, R. F. *et al.* (2012). Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. *Radiat Oncol*, 7(1), 146.

A pesar que ninguno de los dos agentes dadores de boro actualmente utilizados en estudios clínicos, BPA o BSH, cumplen con todos estos requisitos, se han obtenido buenos resultados para el tratamiento de GBM, tanto el originado *de novo* como recurrente (*Figura 9*)<sup>(46, 49, 51)</sup>. Para aquellos tumores desarrollados *de novo*, luego de la resección quirúrgica del mismo seguida del tratamiento con BNCT, se han obtenido valores de supervivencia media de entre 10.4 y 27.1 meses<sup>(49, 51)</sup>. El diseño de compuestos para optimizar la captación de boro por las células tumorales puede permitir aumentar la efectividad terapéutica de la BNCT<sup>(46, 50)</sup>. El mayor desafío en el desarrollo de nuevas entidades portadoras de boro es el desarrollo de agentes selectivos *per se* y poder llegar a concentraciones de los mismos que permitan alcanzar a los niveles de  $^{10}\text{B}$  necesarios para que la BNCT sea efectiva sin tener toxicidad en el tejido normal<sup>(51)</sup>.



**Figura 9.** Eficacia terapéutica de la resección quirúrgica del tumor GBM seguida por el tratamiento de BNCT. En la fila superior de la figura se observa el efecto de esta terapia sobre un tumor desarrollado *de novo*, mientras que en la fila inferior se observa el efecto sobre un tumor recurrente. En ambos casos se observa una reducción en el tamaño del tumor y del edema peritumoral. Imagen extraída de ref. <sup>(49)</sup> Miyatake, S. I. et al. (2016).

<sup>(46)</sup> Wen, P. Y. et al. (2008). <sup>(49)</sup> Miyatake, S. I. et al. (2016). <sup>(50)</sup> Yamamoto, T. et al. (2008). <sup>(51)</sup> Barth, R. F. et al. (2012).

## 5. Antecedentes

De acuerdo a lo planteado en la introducción, existe la falta de un tratamiento efectivo para la enfermedad GBM, la cual en la actualidad es tratada de forma paliativa mediante la resección quirúrgica del tumor, seguido por radioterapia y quimioterapia con el agente alquilante TMZ <sup>(5, 33, 40-44, 47)</sup>. Se han planteado varias terapias alternativas, entre las que se encuentran la terapia dirigida con TKIs <sup>(41-44, 48)</sup> así como la BNCT <sup>(46, 49, 50)</sup>. Dichas terapias alternativas o bien no han resultado en una mayor eficacia respecto al tratamiento convencional, como es el caso de las TKIs, tanto en monoterapia como en conjunto con radioterapia <sup>(41-43)</sup>, así como han resultado en una modesta mejora respecto al tratamiento convencional, como es el caso de la BNCT <sup>(49, 51)</sup>.

En vista de lo anterior, en el Laboratorio de Química Orgánica Medicinal, se comienza una línea de investigación dirigida por los Dres. Marcos Couto y Hugo Cerecetto, donde se pretende desarrollar compuestos novedosos de síntesis que puedan utilizarse en lo que se denomina una terapia dual. Tal terapia dual consiste en combinar la terapia dirigida con TKIs a la BNCT, para lo cual los compuestos de síntesis deben ser capaces de actuar como TKIs al mismo tiempo de ser agentes portadores de boro. Para ello, se toma como punto de partida los TKIs ya existentes erlotinib, lapatinib y sunitinib, los cuales son modificados químicamente para convertirlos también en agentes portadores de boro. Para ello se incorpora en su estructura carboranos, que son estructuras ricas en boro y que además, pueden representar *per se* un farmacóforo <sup>(52, 53)</sup>.

---

(5) Eimer, S. *et al.* (2011). (33) Kumar, M. *et al.* (2015). (40) Alifieris, C. *et al.* (2015). (41) Patel, M. *et al.* (2012). (42) Polivka, J. *et al.* (2012). (43) Minniti, G. *et al.* (2009). (44) Chamberlain, M. (2011). (46) Wen, P. Y. *et al.* (2008). (47) Sasmita, A. O. *et al.* (2018). (48) Arora, A. *et al.* (2005). (49) Miyatake, S. I. *et al.* (2016). (50) Yamamoto, T. *et al.* (2008). (51) Barth, R. F. *et al.* (2012). (52) Scholz, M. *et al.* (2011). Carboranes as pharmacophores: properties, synthesis, and application strategies. *Chem Rev*, 111(11), 7035-7062. (53) Issa, F. *et al.* (2011). Boron in drug discovery: carboranes as unique pharmacophores in biologically active compounds. *Chem Rev*, 111(9), 5701-5722.

Para los derivados desarrollados a partir de erlotinib, se evalúa su actividad antitumoral, obteniéndose interesantes resultados frente a las líneas celulares C6, U87 MG y HT-29, siendo C6 y U87 MG líneas de glioma de rata y GMB humano, respectivamente, mientras que HT-29 es una línea de adenocarcinoma colorrectal humano que sobreexpresa EGFR <sup>(54-56)</sup>. Algunos de estos derivados resultaron ser más tóxicos que erlotinib frente a las tres líneas celulares, así como resultaron ser selectivos por células tumorales en comparación con un cultivo mixto de glía <sup>(54, 56)</sup>. A su vez, también resultaron ser inhibidores del EGFR y en el caso de uno de ellos, constituye un inhibidor más potente del EGFR que erlotinib <sup>(55)</sup>.

Habiéndose obtenido tan alentadores resultados para la serie de erlotinib, se hace necesario hacer lo mismo para las otras series derivadas de los fármacos lapatinib y sunitinib. Por ello, en el contexto de este trabajo final de grado, se decide estudiar la toxicidad de ambas series frente a la línea celular U87 MG, para ahondar en el tipo de mecanismo de muerte celular que estos derivados y sus fármacos padres desencadenan en la U87 MG. Pensando en su aplicabilidad en una terapia dual, es deseable que tales compuestos maten mayoritariamente por apoptosis a las células, ya que de esta forma se reduce la inflamación local, al mismo tiempo que se permite la acumulación de boro en células tumorales. Para el estudio del tipo de mecanismo de muerte celular se plantea el uso de dos técnicas: la citometría de flujo y la <sup>1</sup>H-RMN. De forma adicional, se plantea la realización de experimentos de microscopía confocal, los cuales permitan evidenciar los efectos de los tratamientos evaluados sobre la U87 MG.

---

(54) Couto, M. *et al.* (2017). Small-molecule kinase-inhibitors-loaded boron cluster as hybrid agents for glioma-cell-targeting therapy. *Chem Eur J*, 23(39), 9233-9238. (55) Couto, M. *et al.* (2018). Discovery of Potent EGFR Inhibitors through the Incorporation of a 3D Aromatic Boron Rich Cluster into the 4-Anilinoquinazoline Scaffold: Potential Drugs for Glioma Treatment. *Chem Eur J*, 24(13), 3122-3126. (56) Couto, M. *et al.* (2019). Carboranyl-anilinoquinazoline EGFR-inhibitors: toward 'lead-to-candidate' stage in the drug-development pipeline. *Future Med Chem*, 11(17), 2273-2285.

## 6. Objetivos

### 6.1 *Objetivo general:*

El objetivo general del presente trabajo final de carrera consiste en el estudio del tipo de mecanismo de muerte celular que sufren *in vitro* células de glioblastoma U87 MG por exposición a compuestos de síntesis. Para ello se utilizan las técnicas de citometría de flujo, de  $^1\text{H}$ -RMN y de microscopía confocal

### 6.2 *Objetivos específicos:*

- Establecer dentro de una serie de diecisiete compuestos de síntesis, derivados de los fármacos sunitinib y lapatinib, aquellos que son citotóxicos frente a un cultivo de la línea celular U87 MG.
- Determinar la dosis que inhibe el 50 % de la población inicial,  $\text{IC}_{50}$ , para la línea celular U87 MG de aquellos derivados activos.
- Determinar el tipo de mecanismo de muerte celular que sufren células U87 MG frente al tratamiento de los compuestos activos, a las  $\text{IC}_{50}$ , mediante la técnica de citometría de flujo.
- Elaborar un protocolo experimental para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular de un cultivo de células de U87 MG tratado con compuestos citotóxicos mediante el uso de la técnica  $^1\text{H}$ -NMR.
- Determinar el tipo de mecanismo de muerte celular que sufren células U87 MG frente al tratamiento de los compuestos activos, a las  $\text{IC}_{50}$ , mediante la técnica  $^1\text{H}$ -NMR.
- Evaluar los efectos que sufren células U87 MG frente al tratamiento de los compuestos activos, a las  $\text{IC}_{50}$ , mediante la técnica microscopía confocal.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Cultivo celular

La línea celular de glioblastoma multiforme humano U87 MG fue obtenida de la colección celular de la ATCC (American Tissue Culture Collection, código ATCC HTB-14™). Dichas células son cultivadas a 37 °C en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10 % de FBS (Suero Fetal Bovino) inactivado, 100 U/mL de penicilina, y 100 mg/mL de estreptomina, en una atmósfera húmeda que contiene 5 % de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono). El FBS es inactivado con calor mediante su incubación a 60 °C en baño de agua por 30 minutos. Tanto el DMEM, como el FBS y los antibióticos son comprados a Capricorn Scientific.

Para subcultivar dichas células se utiliza una disolución de tripsina (0.25 % m/v en buffer PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)) suplementada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.38 mg/mL. Es necesario utilizar una disolución de tripsina que contenga EDTA para disgregar estos cultivos celulares para así quelar el ión calcio, el cual participa de las uniones intercelulares y al sustrato, para que de esta forma las proteínas que conforman tales uniones se encuentren más disponibles para ser sustrato de la tripsina. Dicha disolución es obtenida directamente en Thermofisher Scientific. Previo a la utilización de la disolución de tripsina, se realiza un lavado con buffer PBS (pH = 7.4, 0.3 osmolar), para remover por completo el medio suplementado, de forma tal de eliminar la presencia de proteínas en disolución que puedan interferir con la disgregación química del cultivo por parte de la tripsina. El PBS es preparado según el protocolo descrito por el Laboratorio de Genómica Viral y Humana, perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad UASLP (Universidad Autónoma de San Luis Potosí), México<sup>(57)</sup> y es esterilizado por autoclave a 121 °C por 21 minutos.

---

(57). Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina de la Universidad UASLP (2008). Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). *Creative Commons*.

## 7.2 Citotoxicidad celular y determinación de las IC<sub>50</sub>

Tanto para determinar la citotoxicidad celular de los compuestos de interés a dosis fija, así como para el cálculo de la concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) de aquellos compuestos activos, se adhieren 10.000 células U87 MG por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Tales células se adhieren en un volumen de 100 µL de DMEM suplementado por pocillo. Luego de 24 horas de incubación de las mismas, a 37 °C y en atmósfera conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>, se agrega 125 µL de DMEM suplementado fresco a cada pocillo. Transcurridas otras 24 horas adicionales de incubación en las mismas condiciones anteriormente descritas, se tratan las células con las dosis deseadas de los compuestos a ensayar. Para ello se preparan diluciones en DMEM suplementado a una concentración 10X de la concentración a ensayar y se adicionan 25 µL de estas diluciones a cada pocillo. Estas diluciones se preparan a partir de stocks de los compuestos preparados en 100 % dimetil sulfóxido (DMSO), a una concentración de 10 mM de compuesto. Como la dosis máxima a la cual el DMSO no es tóxico para las células es 1 % <sup>(58)</sup>, la dosis máxima ensayada de los compuestos es 100 µM. Cada dosis de compuesto es evaluada por cuadruplicado por placa. La toxicidad de los compuestos es evaluada luego de 24 horas de tratamiento. Finalizada la incubación con compuesto, las células son lavadas dos veces con 200 µL de PBS (pH = 7.4), no estéril, para remover las células muertas y las diluciones de compuesto restante. Para determinar la toxicidad de los compuestos ensayados se utiliza el ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB) según Skehan et al <sup>(59)</sup>. De forma breve, las células son fijadas con 250 µL de una solución de ácido tricloroacético (10 % m/v en DMEM sin suplementar) por 1 hora a 4 °C. Luego de fijadas las células, son lavadas cinco veces con 200 µL de agua destilada mRo y posteriormente son secadas. Las células se tiñen con 50 µL de una disolución de SRB (0.4 % m/v en ácido acético al 1 % v/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, el colorante en exceso es eliminado con lavados con una disolución acuosa de ácido acético (1 %). Se realizan por lo menos 5 lavados hasta verificar que todo el colorante en exceso ha sido eliminado. Las placas se dejan secando a temperatura ambiente por al menos 24 horas. Posteriormente, el colorante de cada pocillo se resuspende en 100 µL de buffer tris(hidroximetil)aminometano (Tris, pH = 10, 10 mM). Se realiza la lectura de absorbancia de cada pocillo a  $\lambda = 540$  nm.

---

<sup>(58)</sup>. Galvao, J. et al. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*, 28(3), 1317-1330. <sup>(59)</sup>. Skehan, P. et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI*, 82(13), 1107-1112.

En cada placa se realizan dos controles: un blanco, donde no se siembran células y un control negativo, donde las células son tratadas con 1 % de DMSO, el cual constituye el vehículo utilizado para los compuestos. El objetivo del blanco es corregir las medidas de absorbancia de cada pocillo por la absorbancia propia de la placa sujeta al tratamiento de tinción con SRB, mientras que el control negativo constituye la referencia respecto a la cual se expresa el porcentaje de supervivencia de cada condición ensayada. El porcentaje de supervivencia celular se calcula según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{(T - B)}{(C - B)} \times 100$$

Siendo T la absorbancia del pocillo tratado, B la absorbancia promedio de los pocillos blanco, y C la absorbancia promedio de los pocillos control.

Para evaluar si el compuesto es o no tóxico para las células U87 MG, primero se evalúa a dosis fija de 100  $\mu\text{M}$ . A efectos de este trabajo final de carrera, aquellos compuestos que presenten un porcentaje de supervivencia celular menor al 50 % para una dosis de 100  $\mu\text{M}$  serán considerados citotóxicos.

A los compuestos que resultan citotóxicos, se les calcula la  $\text{IC}_{50}$ , definida como la dosis de compuesto a la cual la supervivencia celular es del 50 % <sup>(60)</sup>. Para ello, inicialmente se evalúan las dosis 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  y 6,25  $\mu\text{M}$ . Si habiendo evaluado dichas dosis no es posible calcular la  $\text{IC}_{50}$  del compuesto (se trata de un compuesto muy tóxico), se evalúan dosis inferiores variables, dependiendo del aspecto del cultivo a las dosis previamente evaluadas.

### 7.3 Estudios del tipo de mecanismo de muerte celular por citometría de flujo

Para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular desencadenado por cada compuesto, a las  $\text{IC}_{50}$ , en la línea celular U87 MG se utiliza un análisis por citometría de flujo, empleando las tinciones de la unión de Anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y del ingreso de DAPI.

---

(60). Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate  $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$  estimation. *Pharm. Stat.*, 10(2), 128-134.

Para el ensayo se adhieren  $3 \times 10^5$  células U87 MG en placas de cultivo p60. Las células son adheridas en medio DMEM suplementado. Luego de adheridas las células, se las deja crecer por 24 horas a 37 °C y en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se les realiza un cambio de medio con DMEM suplementado y se las incuba otras 24 horas adicionales en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. A 48 horas de adheridas, las células son tratadas con los compuestos de interés a las IC<sub>50</sub> por 24 horas. Al cumplirse ese tiempo, las células son tripsinizadas y las muestras son centrifugadas a 250 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Los pellets resultantes son subsecuentemente teñidos para ser analizados por citometría de flujo.

Para teñir las muestras se utiliza el kit Annexin V, FITC conjugate, MP 13199 de Invitrogen. De acuerdo con el protocolo de dicho kit (MAN0002106), los pellets celulares son resuspendidos en 1 mL de buffer Anexina. La composición del buffer Anexina es 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES), 140 mM de NaCl y 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH = 7.4. Es preparado a una concentración 10X y se lo esteriliza con filtro de 0.2 µm. Al momento de usar, se lleva a la concentración de uso. Se realiza recuento de células totales para ajustar cada suspensión celular a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. De estas suspensiones, se toman 100 µL y se los incuba con 5 µL de una disolución de Anexina V conjugada a FITC (número de catálogo A13199) por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras son llevadas a un volumen final de 400 µL con buffer Anexina. Justo antes de realizar las medidas de las muestras en el citómetro, se agrega a cada muestra 0.4 µL de una solución de DAPI 1/5 (2 mg/mL, número de catálogo H3570, Thermo Fisher Scientific). Las muestras son analizadas en un citómetro FACSAria Fusion.

Como control negativo del experimento, una placa de células es tratada con 1 % de DMSO por 24 horas.

Los residuos (*debris*) celulares, caracterizados por un bajo FSC/SSC, son excluidos en el análisis por la estrategia de *gating*. Para el análisis de las muestras en el citómetro se realizan controles simple marca para cada una de las tinciones (DAPI y Anexina V-FITC), para de ésta forma definir las diferentes poblaciones: la población doble negativa se corresponde con las células viables, la población FITC positiva constituye la población apoptótica de la muestra, mientras que las muestras DAPI positivas, tanto FITC positiva y negativa, constituye la población necrótica de la muestra <sup>(2, 6, 7-9, 25)</sup>. La adquisición de los datos es realizada con el programa BD FACSDiva Software, mientras que el análisis de los mismos es realizado con el programa FlowJo. Se registran 10.000 eventos por muestra.

#### 7.4 Estudios del tipo de mecanismo de muerte celular por <sup>1</sup>H-RMN

Para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular desencadenado por un compuesto dado en la línea celular U87 MG a las IC<sub>50</sub>, se utiliza un análisis por <sup>1</sup>H-RMN, como técnica complementaria al análisis por citometría de flujo. El protocolo seguido con células U87 MG es puesto a punto en la presente tesina de grado, a partir de la bibliografía disponible <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>.

Inicialmente se adhieren  $3 \times 10^6$  células U87 MG en frascos de cultivo T175. Las células son adheridas en medio DMEM suplementado. Los cultivos son incubados por 3 días a 37 °C y en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>, realizándose un cambio de medio con DMEM suplementado 48 horas luego de adheridas. Al cuarto día luego de sembradas las células, las mismas son tratadas con los compuestos de interés a las IC<sub>50</sub>, por 24 horas. Terminado el tratamiento, las células son tripsinizadas y las muestras son centrifugadas a 250 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Los pellets resultantes son resuspendidos en 1 mL de DMEM suplementado. De esta suspensión se toma una alícuota de 20 µL para el recuento de células totales. Cada muestra contiene entre  $3 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  células totales.

---

(2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (7) Van Engeland, M. *et al.* (1996). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Givan, A. L. (1992). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (25) Denecker, G. *et al.* (2000).

El resto de la muestra se vuelve a centrifugar, utilizando las mismas condiciones anteriormente mencionadas y es lavada 3 veces con DBPS (pH = 7.4). Finalmente, las células son resuspendidas en 700  $\mu\text{L}$  de DBPS (pH = 7.4) y son mantenidas en hielo hasta el momento de adquisición del espectro.

Justo antes de adquirir tales espectros, a cada muestra se le agregan 3  $\mu\text{L}$  de DMF anhidra (estándar interno), para poder cuantificar las señales en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, y 70  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (aproximadamente un 10 % del volumen total de la muestra).

Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro Bruker de 400-MHz (Bruker, Karlsruhe, Alemania), adquiriéndose los espectros de protón a una temperatura de trabajo de 24.95 °C y a una frecuencia de 400.13 MHz. Cada espectro de protón consiste de 128 scans adquiridos en 12 minutos, posee una ventana espectral de 8197 Hz y se le suprime la señal correspondiente a los protones del agua.

A cada espectro se le realiza el siguiente análisis como sigue:

- se toma como referencia el singulete de la DMF en 8.03 ppm para referenciar los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del resto de las señales.
- se apodiza el espectro con un filtro exponencial de 2 Hz.
- se corrige la línea de base de forma manual.
- se integra el singulete de la DMF en 8.03 ppm, al cual se le adjudica un valor arbitrario de 10. Todas las señales son integradas respecto al valor de la integración de dicha señal.
- se integran las siguientes señales del espectro:
  - los metilos de los lípidos móviles: se analizan e integran las señales entre 0.800 y 1.152 ppm correspondientes a la señal  $\text{CH}_3$  (protones de los metilos de los lípidos móviles).
  - los metilenos de los lípidos móviles: se analizan e integran las señales entre 1.328 y 1.399 ppm correspondientes a la señal  $\text{CH}_2$  (protones de los metilenos de los lípidos móviles).
  - los metabolitos relacionados con colina: se analizan e integran las señales entre 3.258 y 3.296 ppm, correspondiente a la señal Cho (fosfocolina y colina) y entre 3.297 y 3.345 ppm correspondiente a la señal GPC (glicerofosfocolina).

### 7.5 Ensayos de microscopía confocal

Se realizan ensayos de microscopía confocal sobre cultivos de U87 MG tratados con los compuestos de interés con el fin de obtener información complementaria sobre el efecto de los compuestos estudiados sobre las células cultivadas.

Para ello, primero se realiza un proceso de tinción inespecífico de membrana celular con el colorante PKH26 utilizando el kit PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling, PKH26GL de Sigma-Aldrich. De forma breve, a un pellet de células U87 MG conteniendo  $7.5 \times 10^5$  células se lo incuba por 5 minutos en 400  $\mu$ L de una disolución de colorante PKH26 (2  $\mu$ M). Durante la incubación, la suspensión celular se agita cada 1 minuto. Terminados los 5 minutos de incubación, se agrega igual volumen de FBS sin inactivar, para de esta forma quitar el exceso de colorante que no se ha unido a la membrana celular. Se deja incubando durante 1 minuto. Luego, se realiza un lavado de las células con DMEM suplementado, para finalmente resuspender el pellet celular en un volumen adecuado de DMEM suplementado de forma tal de sembrar  $1.5 \times 10^5$  células en placas de cultivo p35 de fondo de vidrio.

Luego de sembradas las células, se las deja crecer por 24 horas a 37 °C y en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se les realiza un cambio de medio con DMEM suplementado y se las incuba otras 24 horas adicionales a las mismas condiciones anteriormente mencionadas. A 48 horas de sembradas, las células son tratadas con los compuestos de interés a las IC<sub>50</sub> por 24 horas. Luego del tratamiento, las células son lavadas con PBS (pH = 7.4) y son fijadas con 500  $\mu$ L de una disolución de paraformaldehído (4 % m/v) durante 20 minutos a 4 °C. Habiendo fijado las células, las mismas son lavadas 3 veces con PBS (pH = 7.4) y posteriormente son permeabilizadas con 200  $\mu$ L de una solución de tritón (0.1 % m/v en PBS, pH = 7.4) durante 10 minutos y a temperatura ambiente. Después de permeabilizadas, las células son nuevamente lavadas con PBS (pH = 7.4), para luego realizar el bloqueo con 300  $\mu$ L de una disolución de seroalbúmina bovina (BSA, 5 % m/v en PBS, pH = 7.4) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalizado el bloqueo, se realiza la tinción de los preparados con 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de DAPI (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en BSA (1 % en PBS,  $\text{pH} = 7.4$ ). La incubación se realiza toda la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Luego, se realizan 3 lavados con PBS ( $\text{pH} = 7.4$ ), realizándose 10 minutos de incubación por cada lavado. Finalmente, se agrega 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de glicerol (70 % v/v) a las muestras, las cuales están prontas para visualizar al microscopio confocal.

Las imágenes de los preparados celulares son adquiridas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 800, usando un objetivo de inmersión en aceite 63X (apertura numérica 1.3) con el software Zeiss Zen Black.

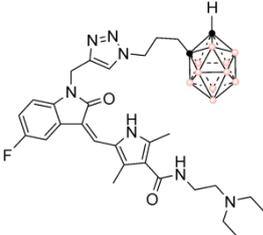
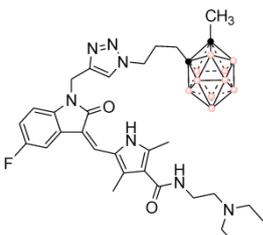
### 7.6 Análisis estadístico

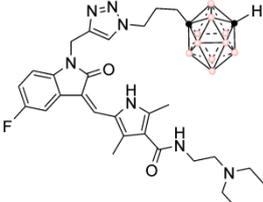
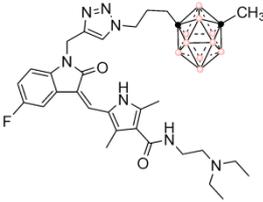
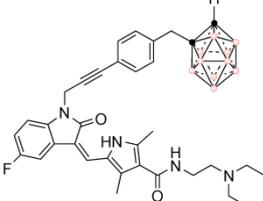
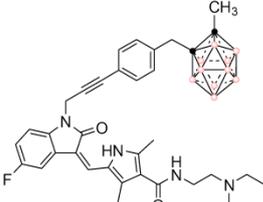
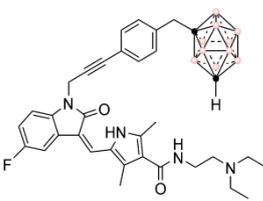
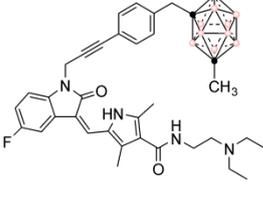
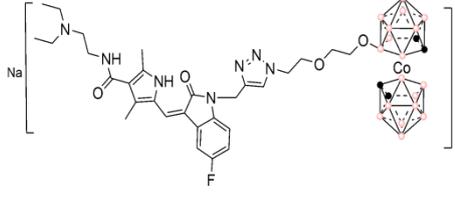
Para analizar si las poblaciones observadas por citometría de flujo o los cambios en el espectro de protón son estadísticamente diferentes respecto a la condición control, se realiza un análisis estadístico utilizando el test Unpaired Sample T Test a dos colas y a nivel de exigencia de  $p < 0.050$ . No se asume que los diferentes grupos de datos tienen la misma desviación estándar; se realiza el test con la corrección de Welch. El análisis estadístico es realizado utilizando el programa GraphPad. De cada experimento se tienen duplicados.

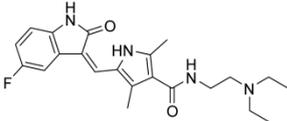
## 8. Resultados y discusión

Como forma de cumplir con los objetivos del presente trabajo primeramente se determina la citotoxicidad, frente a la línea celular de glioblastoma humana U87 MG, de diecisiete compuestos pertenecientes a series de derivados de los fármacos comerciales lapatinib y sunitinib. Para ello, tal y como se detalla en materiales y métodos, todos los compuestos son evaluados inicialmente a dosis fija de 100  $\mu\text{M}$ . Cada compuesto se ensaya por cuadruplicado. Aquellos compuestos para los cuales las células tratadas presentan un porcentaje de supervivencia promedio inferior al 50 % se consideran citotóxicos. A continuación, en la *Tabla 1* y la *Tabla 2*, se resumen los resultados obtenidos de toxicidad de los compuestos ensayados organizados por serie.

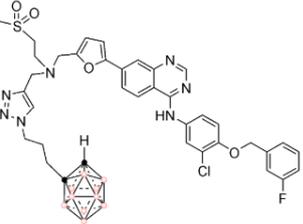
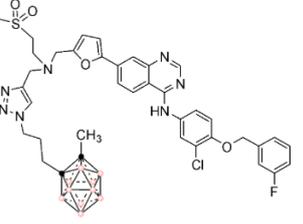
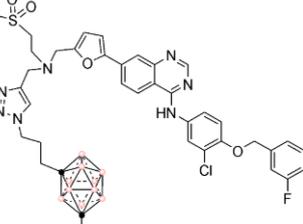
**Tabla 1.** Citotoxicidad de los compuestos pertenecientes a la serie de sunitinib evaluados a dosis fija 100  $\mu\text{M}$ . Se detalla la estructura de cada uno de los compuestos, así como el porcentaje de supervivencia correspondiente (promedio de cuadruplicados) obtenido para un cultivo de U87 MG tratado con la dosis antes mencionada. Como error de la medida se toma la desviación estándar. El fármaco padre del cual derivan todos los compuestos de la serie, sunitinib, también es evaluado. En las estructuras, las esferas rosadas representan vértices -BH, mientras que las esferas negras representan vértices -C.

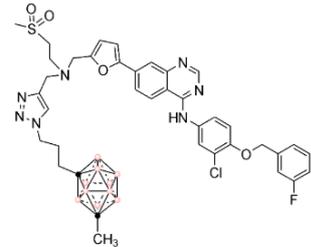
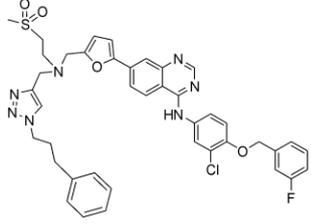
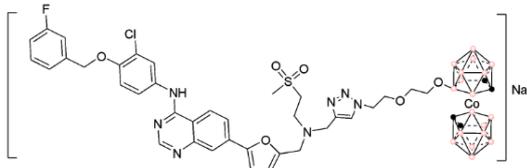
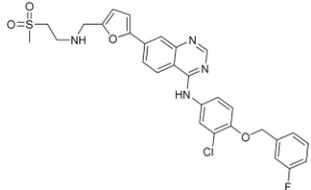
<u>Compuesto</u>	<u>Estructura</u>	<u>Porcentaje de supervivencia U87 MG</u>
1		95 $\pm$ 10
2		16 $\pm$ 5

3		$13 \pm 5$
4		$2 \pm 2$
5		100
6		$92 \pm 8$
7		100
8		$64 \pm 6$
9		$99 \pm 1$

Sunitinib		0
-----------	---	---

**Tabla 2.** Citotoxicidad de los compuestos pertenecientes a la serie de lapatinib evaluados a dosis fija 100  $\mu$ M. Se detalla la estructura de cada uno de los compuestos, así como el porcentaje de supervivencia correspondiente (promedio de cuadruplicados) obtenido para un cultivo de U87 MG tratado con la dosis antes mencionada. Como error de la medida se toma la desviación estándar. El fármaco padre del cual derivan todos los compuestos de la serie, lapatinib, y el bioisómero **14** también son evaluados. En las estructuras, las esferas rosadas representan vértices -BH, mientras que las esferas negras representan vértices -C.

<u>Compuesto</u>	<u>Estructura</u>	<u>Porcentaje de supervivencia U87 MG</u>
10		66 $\pm$ 3
11		3 $\pm$ 2
12		85 $\pm$ 5

13		77 ± 5
14		91 ± 3
15		66 ± 5
Lapatinib		98 ± 2

De acuerdo a lo anteriormente establecido, los compuestos considerados citotóxicos a 100  $\mu$ M, son:

- dentro de la serie de sunitinib, los derivados **2**, **3** y **4**. El fármaco padre, sunitinib, también constituye un compuesto citotóxico.
- dentro de la serie de lapatinib, el único derivado citotóxico lo constituye el derivado **11**. El fármaco padre, lapatinib, no es considerado un compuesto citotóxico según el criterio establecido. Sin embargo, será incluido en ensayos posteriores a modo de referencia.

Para los compuestos citotóxicos, se calcula la  $IC_{50}$ , definida como la dosis del compuesto a la cual hay un 50 % de supervivencia celular <sup>(60)</sup>. Para ello se evalúan, cinco dosis diferentes de cada compuesto, ensayando cada dosis por cuadruplicado. Para cada dosis se establece el porcentaje de supervivencia celular y se construyen los gráficos de supervivencia celular en función de la concentración del compuesto en cuestión. Los datos se ajustan a una función sigmoidea. A partir del valor del punto de inflexión de la curva sigmoidea, a la cual se ajustan los datos, se obtiene la  $IC_{50}$  para cada compuesto. A continuación, se muestran ejemplos de los gráficos de supervivencia celular en función de la concentración de compuesto para los derivados **2** a **4** de la serie de sunitinib así como para el propio sunitinib, y para el derivado **11** de la serie de lapatinib (*Figuras 1-6*).

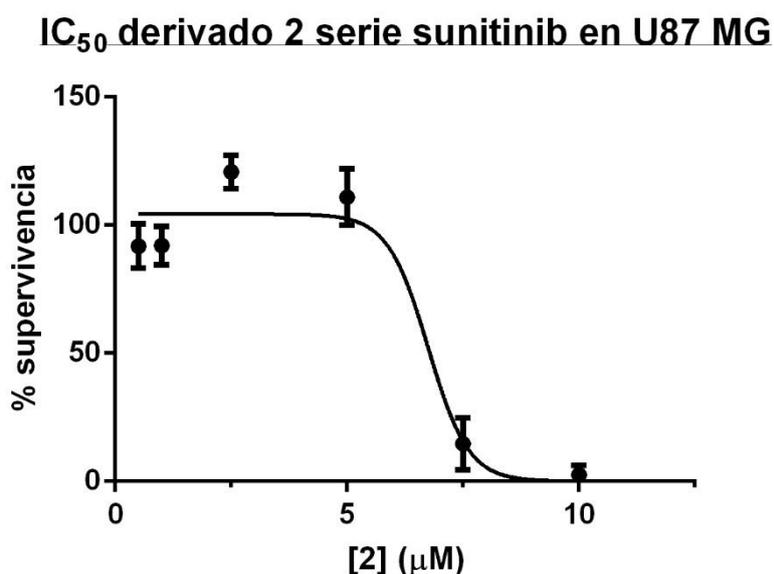


Figura 1. Supervivencia celular en función de la concentración del derivado **2** de la serie de sunitinib. Se grafica el promedio de supervivencia celular a cada dosis evaluada, junto con la desviación estándar, en función de la concentración del compuesto evaluado. Los datos se ajustan a una función sigmoidea de dosis respuesta fijando el valor de la asíntota inferior de la curva a un valor de 0.

---

<sup>(60)</sup>. Sebaugh, J. L. (2011).

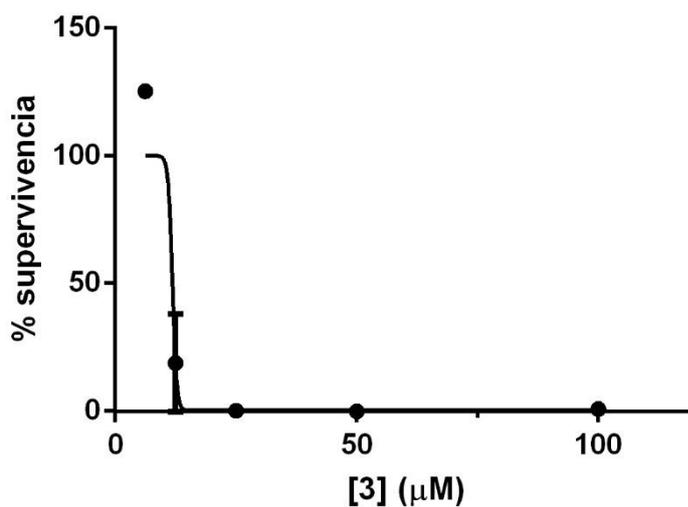
**IC<sub>50</sub> derivado 3 serie sunitinib en U87 MG**

Figura 2. Supervivencia celular en función de la concentración del derivado 3 de la serie de sunitinib. Se grafica el promedio de supervivencia celular a cada dosis evaluada, junto con la desviación estándar, en función de la concentración del compuesto evaluado. Los datos se ajustan a una función sigmoidea de dosis respuesta fijando el valor de la asíntota superior de la curva a un valor de 100.

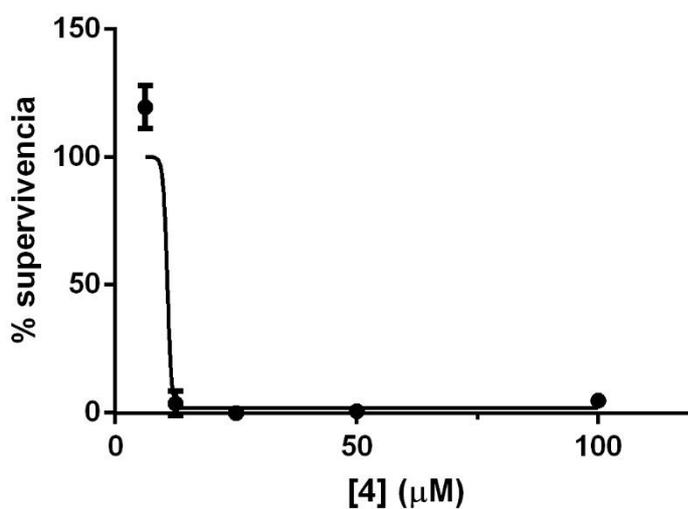
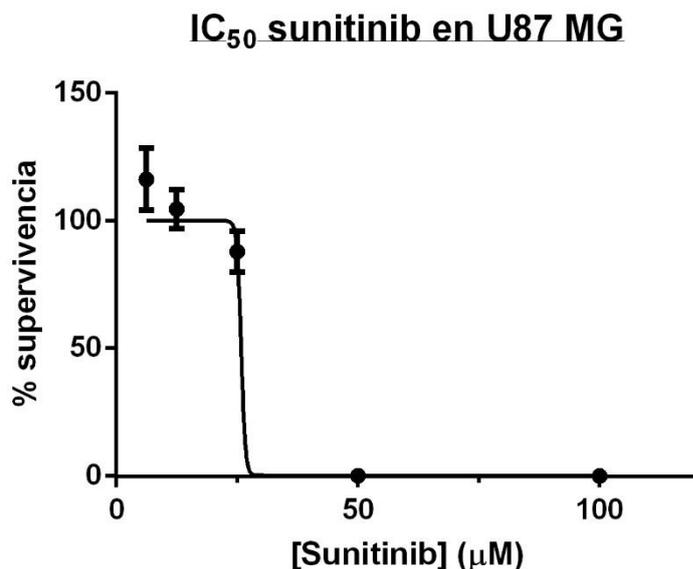
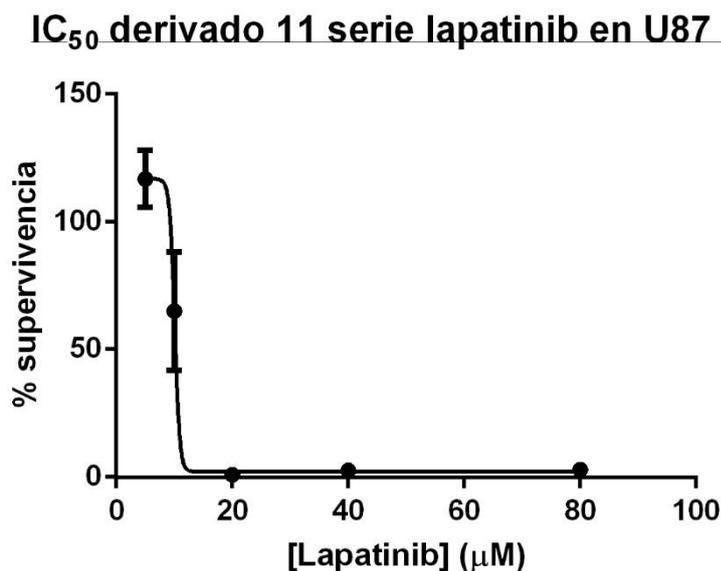
**IC<sub>50</sub> derivado 4 serie sunitinib en U87 MG**

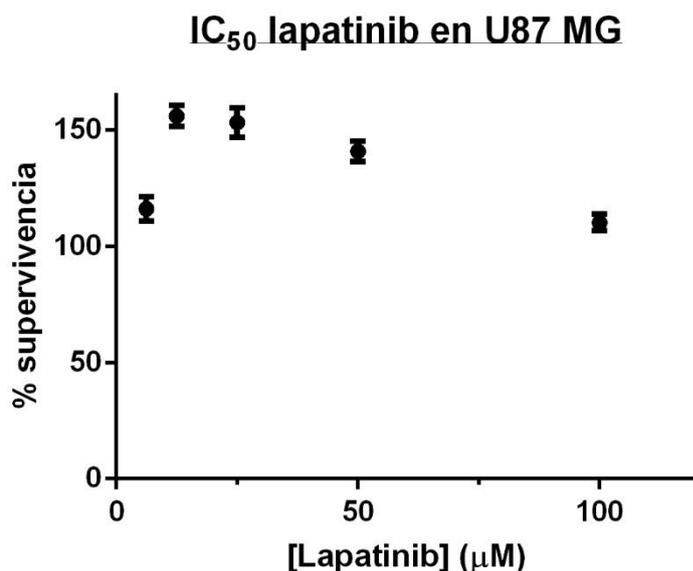
Figura 3. Supervivencia celular en función de la concentración del derivado 4 de la serie de sunitinib. Se grafica el promedio de supervivencia celular a cada dosis evaluada, junto con la desviación estándar, en función de la concentración del compuesto evaluado. Los datos se ajustan a una función sigmoidea de dosis respuesta fijando el valor de la asíntota superior de la curva a un valor de 100.



**Figura 4.** Supervivencia celular en función de la concentración de sunitinib. Se grafica el promedio de supervivencia celular a cada dosis evaluada, junto con la desviación estándar, en función de la concentración del compuesto evaluado. Los datos se ajustan a una función sigmoidea de dosis respuesta fijando el valor de la asíntota superior de la curva a un valor de 100 y el valor de la asíntota inferior a 0.



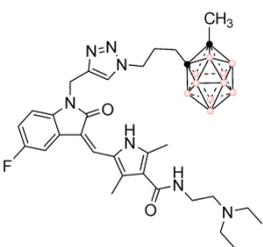
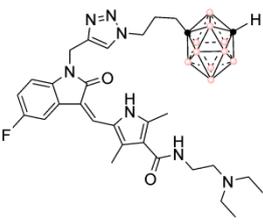
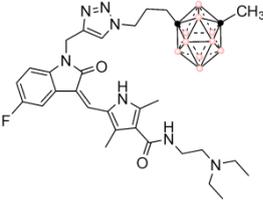
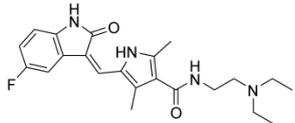
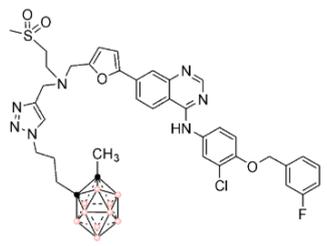
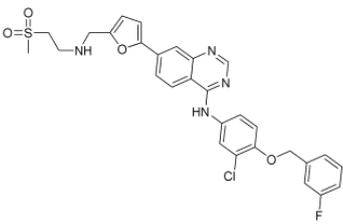
**Figura 5.** Supervivencia celular en función de la concentración del derivado 11 de la serie de lapatinib. Se grafica el promedio de supervivencia celular a cada dosis evaluada, junto con la desviación estándar, en función de la concentración del compuesto evaluado. Los datos se ajustan a una función sigmoidea de dosis respuesta.



**Figura 6.** Supervivencia celular en función de la concentración de lapatinib. Se grafica el promedio de supervivencia celular a cada dosis evaluada, junto con la desviación estándar, en función de la concentración del compuesto evaluado. Se puede concluir mirando el gráfico que no hay efecto dosis-respuesta, en el rango de dosis 100 µM - 6.25 µM, frente al tratamiento de un cultivo de U87 MG con dosis variables de lapatinib.

A modo de resumen en la [Tabla 3](#) se presenta para cada compuesto, la estructura y la IC<sub>50</sub> determinada para la línea celular U87 MG. En dicha tabla se incluye al fármaco lapatinib, a pesar de no haberlo considerado un compuesto citotóxico, en las condiciones del ensayo del presente trabajo, y por ende no haber calculado su dosis IC<sub>50</sub>. Se lo incluye a modo de referencia para el derivado **11**, el único derivado de la serie del lapatinib considerado de citotoxicidad relevante.

**Tabla 3.** IC<sub>50</sub> de los compuestos citotóxicos determinadas para la línea celular U87 MG. Las IC<sub>50</sub> son expresadas en μM.

<u>Compuesto</u>	<u>Serie</u>	<u>Estructura</u>	<u>IC<sub>50</sub> en U87 MG</u>
2	Sunitinib		6.8 ± 0.2
3	Sunitinib		8.0 ± 0.2
4	Sunitinib		8 ± 1
Sunitinib	-		32.2 ± 0.2
11	Lapatinib		10.1 ± 0.1
Lapatinib	-		>100

De acuerdo a los resultados mostrados tanto en la *Tabla 1* y *2*, así como en la *Tabla 3*, se puede observar que de forma generalizada la serie derivada del fármaco sunitinib así como el propio sunitinib son compuestos más citotóxicos para las células U87 MG en comparación con la serie derivada de lapatinib así como el propio lapatinib.

Dicha observación deviene que hay mayor cantidad de derivados que son citotóxicos pertenecientes a la serie de sunitinib en comparación con aquella derivada de lapatinib, así como el hecho que mientras el fármaco sunitinib constituye un compuesto citotóxico en las condiciones ensayadas, lapatinib no lo es. De acuerdo a la información disponible en la bibliografía, este comportamiento experimental puede explicarse por el hecho que lapatinib posee un menor efecto sobre la señalización a través de la vía PI3-K/Akt, la cual es crítica para la proliferación de células de glioma <sup>(61)</sup>.

A continuación, se selecciona un derivado de cada serie para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular por el cual muere las células de glioma U87 MG cuando son tratadas con la IC<sub>50</sub> de tales compuestos. Son seleccionados los siguientes derivados:

- de la serie de sunitinib se selecciona el derivado **3**.

Dicho compuesto es seleccionado en vista de varias razones. Por un lado, de acuerdo a la bibliografía disponible, los isómeros *orto*-carboranos serían menos estables en disolución en comparación con otros isómeros, *meta* o *para*-carboranos <sup>(62)</sup>. Debido a que el derivado **2** es un isómero *orto* y los derivados **3** y **4** son isómeros *meta*, se descarta, para más estudios, en primera instancia el derivado **2**. Por otro lado, la disponibilidad de reactivos y precursores sintéticos llevaron a seleccionar el derivado **3**.

---

(61) Giannopoulou, E. *et al.* (2010). An in vitro study, evaluating the effect of sunitinib and/or lapatinib on two glioma cell lines. *Invest New Drugs*, 28(5), 554-560. (62) Worm, Dennis J. *et al.* (2019) Selective neuropeptide Y conjugates with maximized carborane loading as promising boron delivery agents for boron neutron capture therapy. *J. Med. Chem.*

- de la serie del lapatinib se selecciona el derivado **11**.

Dicho compuesto es seleccionado dado que es el único derivado activo de dicha serie.

Para comenzar con los estudios del tipo de mecanismo de muerte celular que desencadenan los compuestos anteriormente seleccionados, se realizan ensayos de citometría de flujo con dos tinciones que permitirán el análisis. Por un lado se sigue la externalización de la fosfatidilserina, mediante la tinción de las muestras con una disolución de Anexina V conjugada al fluorocromo FITC (Anexina V-FITC), y por otro se sigue la exclusión de un colorante vital, utilizándose DAPI. Los experimentos de citometría de flujo se realizan por duplicado.

Como se discute en la introducción de la presente tesina, la externalización de la fosfatidilserina es considerada una característica de la puesta en marcha de un proceso apoptótico en células <sup>(2, 6-9)</sup>. Sin embargo, en células sufriendo un proceso necrótico también hay cambios en la composición de la membrana plasmática, en particular también ocurre externalización de la fosfatidilserina. La diferencia entre un proceso apoptótico y uno necrótico es cuándo y cómo ocurre. Respecto al momento en cuándo ocurre la externalización de la fosfatidilserina, en un proceso apoptótico ocurre en las etapas iniciales del mismo, cuando aún las células presentan integridad de membrana, mientras que en un proceso necrótico la externalización de la fosfatidilserina y la pérdida de integridad de membrana ocurren al mismo tiempo <sup>(2, 6)</sup>. Es por eso que es necesario realizar un análisis con dos tinciones, combinando la utilización de una disolución de Anexina V conjugada a un fluorocromo con la tinción con un colorante vital <sup>(6, 25)</sup>. La exclusión de tal colorante vital, en este trabajo siendo DAPI, permite determinar la integridad de membrana: aquellas células que lo puedan excluir presentan integridad de membrana, mientras que las células que no lo hacen han perdido su integridad de membrana.

De esta forma, utilizando el análisis de dos tinciones se pueden diferenciar células vivas, apoptóticas y necróticas <sup>(2, 6, 9)</sup>:

---

(2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (7) Van Engeland, M. *et al.* (1996). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Givan, A. L. (1992). (25) Denecker, G. *et al.* (2000).

- las células vivas presentan integridad de membrana y la fosfatidilserina se encuentra en la cara citosólica de la membrana plasmática. Por lo tanto, las células vivas consisten en la población doble negativa frente a las tinciones con Anexina V-FITC/DAPI.
- las células apoptóticas tempranas presentan integridad de membrana y la fosfatidilserina se encuentra en la cara extracelular de la membrana plasmática. En consecuencia, son definidas como la población positiva para Anexina V-FITC.
- las células necróticas presentan pérdida de integridad de membrana. En consecuencia, representan la población positiva para DAPI.

Además de las poblaciones anteriormente mencionadas, existe una cuarta población definida por la tinción doblemente positiva con Anexina V-FITC/DAPI. De acuerdo a ciertos autores, ésta población celular está constituida por células evolucionando hacia un proceso apoptótico, pero en un estadio más avanzado, donde además de haber externalizado la fosfatidilserina, las células han perdido su integridad de membrana <sup>(10, 18, 61)</sup>.

Sin embargo, también existe bibliografía donde se describe que esta población celular está formada tanto por células necróticas como por células apoptóticas, ya que como en ambos procesos de muerte celular pueden ocurrir ambos fenómenos, entendiéndose la externalización de la fosfatidilserina y la pérdida de integridad de membrana, no es posible afirmar que la población doble positiva provenga únicamente de células cursando un proceso apoptótico más avanzado <sup>(2, 6-9, 25)</sup>.

En vista de las dos posiciones presentes en la bibliografía respecto a la naturaleza de la población doblemente positiva para las tinciones Anexina-FITC/DAPI, se decide que:

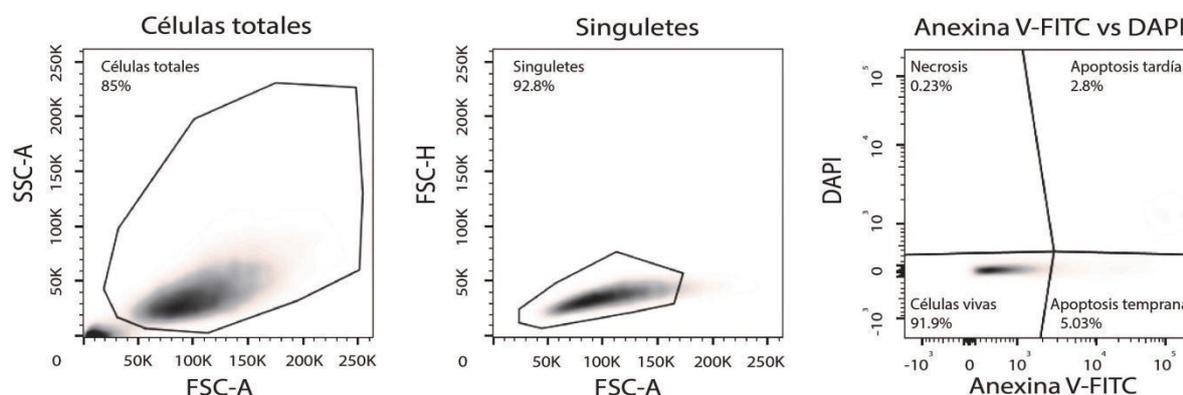
- en la estrategia de gating dicha población reciba el nombre de "apoptosis tardía"
- en la interpretación de los resultados se tenga en cuenta que la población de apoptosis tardía pueda estar formada por células sufriendo, también, un proceso necrótico.

---

(2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (7) Van Engeland, M. *et al.* (1996). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Givan, A. L. (1992). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (25) Denecker, G. *et al.* (2000). (61) Giannopoulou, E., *et al.* (2010).

Por lo tanto, para analizar los datos obtenidos a partir de la citometría de flujo se sigue la estrategia de gating ilustrada en la [Figura 7](#):

- primero se define la población "Células totales" en el dot plot SSC-A vs. FSC-A, descartando los debris celulares caracterizados por bajos SSC y FSC.
- dentro de la población "Células totales", se seleccionan los eventos singuletes en el dot plot FSC-H vs FSC-A, definiendo la población "Singuletes". Los singuletes son aquellas células que hayan pasado por el punto de interrogación del equipo como partículas aisladas.
- finalmente, dentro de la población "Singuletes" se definen cuatro poblaciones en el dot plot DAPI-A vs FITC-A: Células vivas, Necrosis, Apoptosis temprana y Apoptosis tardía de acuerdo a los cuadrantes definidos de acuerdo a las marcas de los controles simple marca.



[Figura 7](#). Estrategia de gating utilizada para el análisis de datos obtenidos a partir de experimentos de citometría de flujo. A modo de ejemplo, se muestra la estrategia de gating utilizada sobre los datos correspondientes a la muestra control de uno de los experimentos realizados. La muestra control consiste de un cultivo de células U87 MG tratadas con DMSO al 1 % por 24 horas.

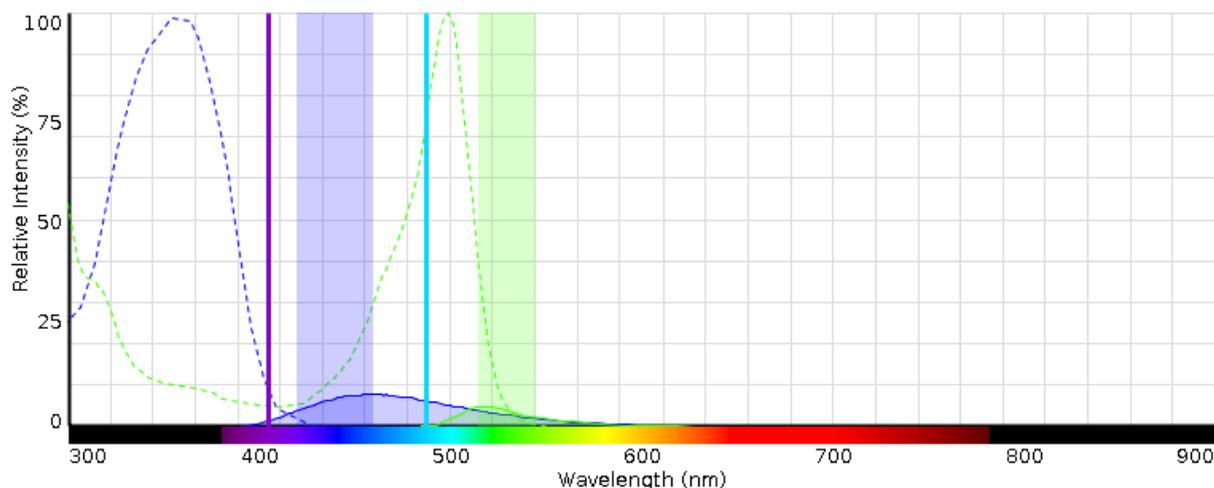
En el análisis de los resultados de los datos obtenidos por citometría de flujo se decide no compensar las señales para los fluorocromos DAPI y FITC. Esto se debe a varias razones:

- por un lado, cada fluoróforo se excita con un láser diferente: el DAPI se excita con un láser que emite luz de longitud de onda de 405 nm, mientras que el FITC se excita con un láser que emite luz de longitud de onda de 488 nm. Como se puede observar en el espectro de excitación de DAPI y FITC, mostrados en la [Figura 8](#), a 405 nm (línea violeta) absorbe mayoritariamente el fluoróforo DAPI, en una

relación aproximada de 2 a 1. De forma similar, a 488 nm (línea celeste) absorbe únicamente el fluoróforo FITC.

- por otro lado, la emisión de cada fluoróforo es detectado por diferentes detectores. En el caso del DAPI, su fluorescencia es detectada por un detector que detecta luz de longitud de onda entre 425 nm y 475 nm, mientras que en el caso de FITC, se utiliza el detector que detecta luz de longitud de onda entre 515 nm y 545 nm. Esto hace que si bien cuando se excita la muestra con el láser de 405 nm, se excitan ambos fluoróforos (aunque se excita el DAPI en mayor medida), la luz emitida por el FITC no será detectada por el detector que detecta la fluorescencia de DAPI, debido a que la luz emitida por FITC es de longitud de onda de 488 nm en adelante (ver *Figura 8*, espectro de emisión de FITC). En el caso de FITC, si bien el detector utilizado para detectar su fluorescencia emitida es capaz de detectar luz emitida por el DAPI (ver *Figura 8*, espectro de emisión de DAPI), cuando se excita al fluoróforo FITC con el láser de 488 nm, no se excita el fluoróforo DAPI, lo que hace que por lo tanto dicho fluoróforo no emita luz por fluorescencia y por lo tanto, no haya detección de la misma por el detector de 515-545 nm.
- finalmente, observando tanto las muestras correspondientes a los controles de simple marca, así como las muestras correspondientes a los diferentes tratamientos, no se evidencia sangrado de señal de DAPI hacia FITC y viceversa.

Por lo tanto, en vista de todas las razones enumeradas anteriormente, no se considera necesario compensar las señales para los fluorocromos DAPI y FITC.

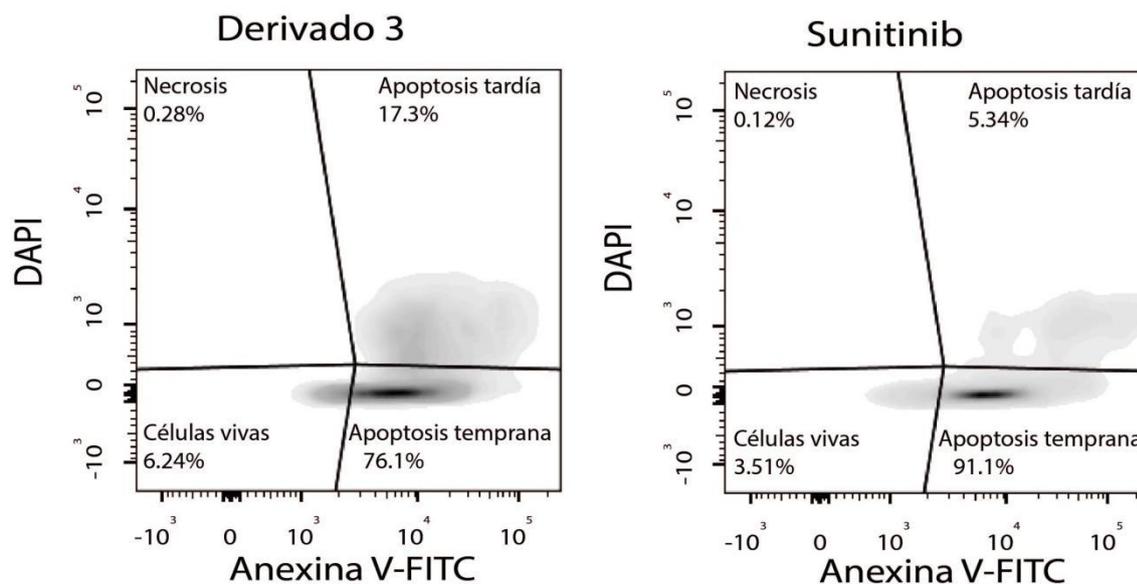


**Figura 8.** Espectros de excitación y emisión de los fluorocromos utilizados para los experimentos de citometría de flujo. En azul se muestran los espectros de excitación y emisión para DAPI, mientras que en verde se muestran los espectros de excitación y emisión para FITC. En línea punteada se muestran los espectros de excitación y en línea continua se muestran los espectros de emisión. La línea violeta vertical se corresponde con luz de longitud de onda de 405 nm, mientras que la línea celeste vertical se corresponde con luz de longitud de onda 488 nm. La zona sombreada con violeta se corresponde con el detector de luz 425-475 nm, mientras que la zona sombreada con verde se corresponde con el detector de luz 515-545 nm. Imagen obtenida de <https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>. Fecha de ingreso: 15/02/2020.

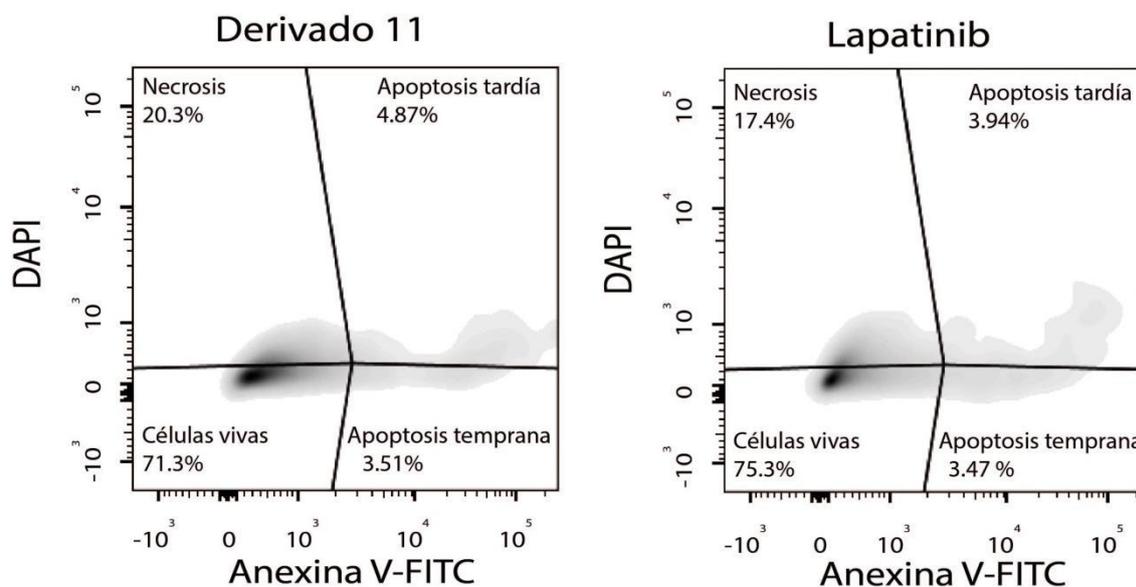
El experimento de citometría de flujo se realiza por duplicado. A partir de los datos experimentales obtenidos, se obtienen los dot plots correspondientes a cada una de las muestras de intensidad de fluorescencia DAPI vs. FITC. A continuación se presentan tales gráficos para las diferentes muestras para uno de los experimentos, el cual es representativo de los ensayos realizados. Las diferentes muestras consisten en un cultivo de células U87 MG tratadas, por 24 horas, con la  $IC_{50}$  de cada uno de los compuestos seleccionados. Además, también son evaluados los compuestos padres a partir de los cuales los derivados fueron diseñados y preparados, también a la  $IC_{50}$  y por 24 horas. Por lo tanto, los tratamientos evaluados son:

1. El derivado **3** de la serie de sunitinib a la dosis de 8  $\mu$ M.
2. Sunitinib a la dosis de 32  $\mu$ M.
3. El derivado **11** de la serie de lapatinib a la dosis de 10  $\mu$ M.
4. Lapatinib a la dosis de 10  $\mu$ M. En el caso particular de lapatinib, el cual no es un compuesto activo para la línea celular U87 MG entre las dosis 6.25  $\mu$ M-100  $\mu$ M, es evaluado a la misma dosis que su derivado **11**.

Los resultados obtenidos se muestran en las *Figuras 9 y 10*.



**Figura 9.** Resultados experimentales de citometría de flujo para la muestras tratadas con el derivado **3** de la serie de sunitinib (izquierda) y con sunitinib (derecha). Se muestra el dot plot de intensidad de fluorescencia DAPI vs. FITC, junto con los porcentajes correspondientes a cada población celular.



**Figura 10.** Resultados experimentales de citometría de flujo para la muestras tratadas con el derivado **11** de la serie de lapatinib (izquierda) y con lapatinib (derecha). Se muestra el dot plot de intensidad de fluorescencia DAPI vs. FITC, junto con los porcentajes correspondientes a cada población celular.

De acuerdo a lo establecido anteriormente, se puede observar que tanto el derivado **3** de la serie de sunitinib como el propio sunitinib llevan a la muerte celular de la línea U87 MG, cuando son tratadas con la  $IC_{50}$  de los mismos y por 24 horas, mayoritariamente por un proceso apoptótico, tal y como se puede observar en la Figuras 9. La diferencia entre la población apoptótica temprana presente en el dot plot DAPI vs FITC de las Figuras 9 para la muestra tratada con el derivado **3**, es estadísticamente representativa respecto al control de la Figura 7, con  $p$  valor de 0.049. Si bien en el caso de la muestra tratada con sunitinib esto no sucede, el  $p$  valor obtenido del test estadístico es de 0.081, se puede decir de todas formas que hay una clara tendencia a que la población apoptótica temprana sea diferente de la observada en el control. Es probable que el hecho que no se obtenga un  $p$  valor menor a 0.050 para la muestra tratada con sunitinib se deba al bajo número de repeticiones de experimentos de citometría de flujo realizados. A continuación, en la Figura 11, se muestra de forma cuantitativa, que el derivado **3** y sunitinib muestran un claro perfil apoptótico.

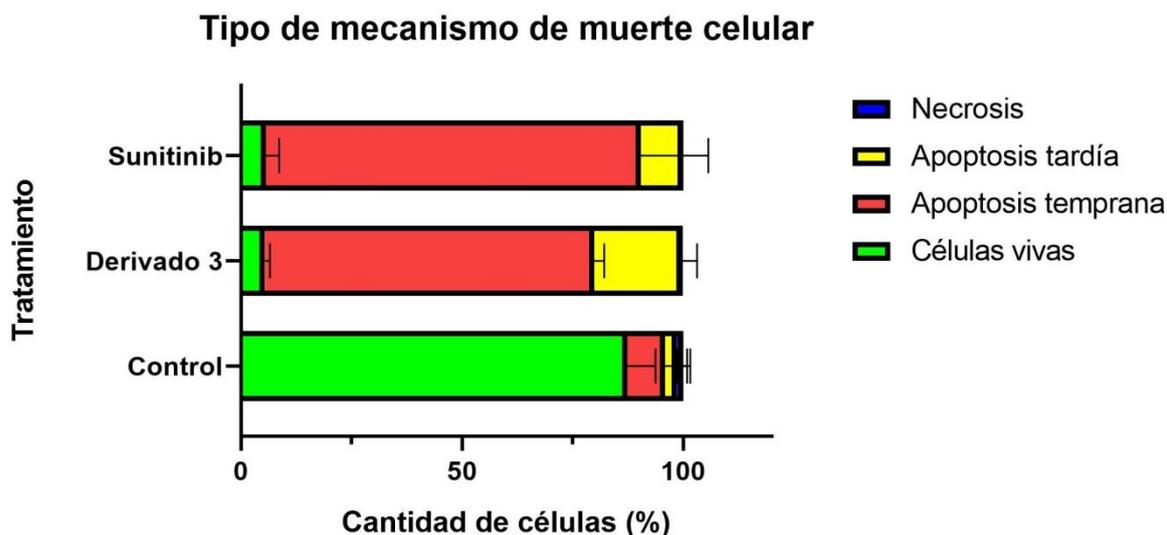


Figura 11. Tipo de mecanismo de muerte celular desencadenado por el tratamiento con el derivado **3** de la serie de sunitinib y con sunitinib. Se muestran en un gráfico de barra los porcentajes de células correspondientes a cada población celular definida en el dot plot DAPI vs. FITC para cada muestra. Los porcentajes de células mostrados corresponden con el promedio de los porcentajes de los dos experimentos realizados, y son graficados junto con la desviación estándar como error. Al comparar las poblaciones de células de las muestras tratadas con el derivado **3** o con sunitinib respecto al control, se tiene que: para la muestra tratada con el derivado **3** tanto las poblaciones de Células vivas como Apoptosis temprana son significativamente diferentes a aquellas de la muestra control a nivel de 0.050, obteniéndose los siguientes  $p$  valores de 0.029 y 0.049 respectivamente; para la muestra tratada con sunitinib tanto las poblaciones de Células vivas como Apoptosis temprana no son significativamente diferentes a aquellas de la muestra control a nivel de 0.050, obteniéndose los siguientes  $p$  valores de 0.052 y 0.081 respectivamente.

A partir de la Figura 11, se puede evidenciar que tanto el derivado **3** así como sunitinib, inducen un mismo perfil de muerte: ambos matan por apoptosis y a su vez se mantiene una proporción donde la población apoptótica temprana predomina sobre la apoptótica tardía. El hecho que ambos compuestos presentan un mismo perfil de muerte puede dar a interpretar varias cosas.

En primer lugar, el hecho que puede que la toxicidad de ambos compuestos frente a la línea celular U87 MG venga dado por el motivo estructural que comparten, entiéndase la subestructura química de sunitinib y en particular, dentro de la misma, el motivo 5-fluoroindolin-2-ona <sup>(63-65)</sup>. Este motivo permite la interacción con un cierto número de receptores celulares tipo tirosina quinasas, los cuales al ser blanco de estos compuestos, llevan a la transducción de señales que finaliza con el desencadenamiento de un proceso apoptótico <sup>(64)</sup>.

En el caso de sunitinib, se encuentra publicado el mapa de tirosina quinasa (Kinoma) con las cuales es capaz de interactuar e inhibir y debido a que es capaz de inhibir una gran cantidad, entre ellas c-Kit, FLT3 y los receptores para los factores de crecimiento PDGF y VEGF, es que se lo describe como un MTKI <sup>(65)</sup>. Debido a que el derivado **3** es un compuesto más citotóxico que sunitinib, en vista de la diferencia que hay entre sus IC<sub>50</sub>, es probable que la presencia de la subestructura derivada de carborano, en el derivado **3**, sea relevante para su interacción a nivel celular con los receptores tipo tirosina quinasas a pesar de que su efecto inhibitorio pueda ser dado en parte por la estructura que comparte con su compuesto padre. La presencia del clúster de boro en la estructura del derivado **3** puede que permita maximizar las interacciones con los receptores tirosina quinasa celulares con los cuales sunitinib ya interactúa, o incluso, es posible que la presencia del clúster de boro permita la interacción con otros receptores <sup>(66, 67)</sup>. El clúster de boro es un farmacóforo, y como tal es capaz de interactuar con biomoléculas, a través de fundamentalmente dos interacciones: enlaces de hidrógeno y enlaces de dihidrógeno. Los primeros se forman entre los grupos C-H presentes en el clúster de boro, los cuales poseen átomos de hidrógeno con carácter ácidos, y por lo tanto son capaces de interaccionar átomos de oxígeno, flúor, nitrógeno y azufre, así como con sistemas π presentes en la biomoléculas a través de enlaces de hidrógeno <sup>(66, 68)</sup>.

---

<sup>(63)</sup> Mena, A. C. *et al.* (2010). Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib. *Anti-Cancer Drug*, 21, S3-S11. <sup>(64)</sup> Atkins, M. *et al.* (2006). Sunitinib maleate. *Nat. Rev.*, 5, 279-280. <sup>(65)</sup> McTigue, M. *et al.* (2012). Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *PNAS*, 109(45), 18281-18289. <sup>(66)</sup> Scholz, M. *et al.* (2011). Carbaboranes as pharmacophores: properties, synthesis, and application strategies. *Chem Rev*, 111(11), 7035-7062. <sup>(67)</sup> Issa, F. *et al.* (2011). Boron in drug discovery: carboranes as unique pharmacophores in biologically active compounds. *Chem Rev*, 111(9), 5701-5722. <sup>(68)</sup> Fanfrlík, J. *et al.* (2006). Interaction of carboranes with biomolecules: formation of dihydrogen bonds. *Chem Phys Chem*, 7(5), 1100-1105.

Además, los grupos B-H, donde el hidrógeno presenta un carácter de hidruro, permite la formación de enlaces de dihidrógeno con átomos de hidrógeno presentes en las biomoléculas, condicionado que éstos se encuentren unidos a un átomo cuya electronegatividad sea mayor a la del hidrógeno <sup>(66, 68)</sup>. De forma adicional, la presencia de este grupo podría estar modificando además del blanco celular y la afinidad con la que se une, la cinética con la cual actúa el derivado **3** como potencial inhibidor.

El hecho que tanto las células tratadas con el derivado **3** como las tratadas con sunitinib presentan un cierto porcentaje de células sufriendo un proceso apoptótico tardío, en comparación con el control, podría llegar a ser relevante. En línea con lo discutido antes, no se puede descartar que en la población "apoptosis tardía" existe presencia de células que hayan muerto por un proceso necrótico y que sea este proceso, y no un proceso apoptótico, el que haya llevado a la pérdida de integridad de membrana y a la exposición de fosfatidilserina. Considerando que parte de la población apoptótica tardía se corresponda con células que en realidad han sufrido un proceso necrótico, esto puede llegar a ser relevante durante la interpretación de la muerte por <sup>1</sup>H-RMN, debido a que de acuerdo a la bibliografía existen ciertos patrones de cambios asociados a cada tipo de mecanismo de muerte celular <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>.

En cuanto a los resultados correspondientes a la serie de lapatinib, de la Figura 10 se puede concluir que sucede algo similar que con la serie de sunitinib. Tanto el derivado **11** como lapatinib desencadenan el mismo tipo de mecanismo de muerte celular: las células U87 MG tratadas a la IC<sub>50</sub> por 24 horas mueren mayoritariamente por necrosis. Sin embargo, la diferencia entre las poblaciones necróticas en las muestras tratadas con el derivado **11** como con lapatinib respecto de la muestra control, no es estadísticamente representativa, obteniéndose valores *p* valor de 0.129 y 0.451 para la muestra tratada con el derivado **11** y la muestra tratada con lapatinib, respectivamente.

Una vez más, es probable que no se obtengan valores de *p* menores a 0.05 debido al pequeño número de repeticiones del experimento, particularmente para la muestra que es tratada con el derivado **11** de la serie de lapatinib.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (66) Scholz, M. *et al.* (2011). (68) Fanfrlík, J. *et al.* (2006).

En relación a los resultados obtenidos para la serie de lapatinib hay varias cosas interesantes. Por un lado, el hecho que lapatinib a una dosis de 10  $\mu\text{M}$  sea capaz de desencadenar un mecanismo de muerte celular, cuando previamente había sido clasificado como un compuesto no citotóxico. La interpretación de este hecho recae en las diferencias entre las técnicas de citometría de flujo y el método SRB mediante el cual se determina la  $\text{IC}_{50}$  de las diferentes moléculas estudiadas en ésta tesina. Mediante el método de SRB se cuantifica de forma relativa la cantidad de proteína celular de células fijadas a una superficie. La línea celular U87 MG es una línea tumoral que crece adherida a una superficie, y por lo tanto, cuando una célula muere, se desprende de la superficie. En consecuencia, aquellas células que ya hayan muerto no serán tenidas en cuenta en la medida de cantidad de proteína celular realizada en el método de SRB ya que durante el procedimiento son descartadas con el sobrenadante y no son fijadas a la superficie. Sin embargo, aquellas células en proceso de morir, que muestren señales como exposición de fosfatidilserina así como pérdida de la integridad de membrana, mientras se mantengan lo suficientemente adheridas a la superficie, y no sean descartadas con el sobrenadante, serán consideradas como células vivas <sup>(59)</sup>.

Por lo tanto, es posible que, aunque en el rango de dosis evaluadas para el fármaco lapatinib, no se detecte un porcentaje de células muertas del 50 %, es decir la  $\text{IC}_{50}$ , puede que a tales dosis si se haya inducido la muerte en cierta población celular, la cual es considerada como viva por el método de SRB siempre y cuando permanezca lo suficientemente adherida a la superficie. Tal población sí es posible detectarla mediante citometría de flujo, tal y como sucede para la muestra tratada con el fármaco lapatinib.

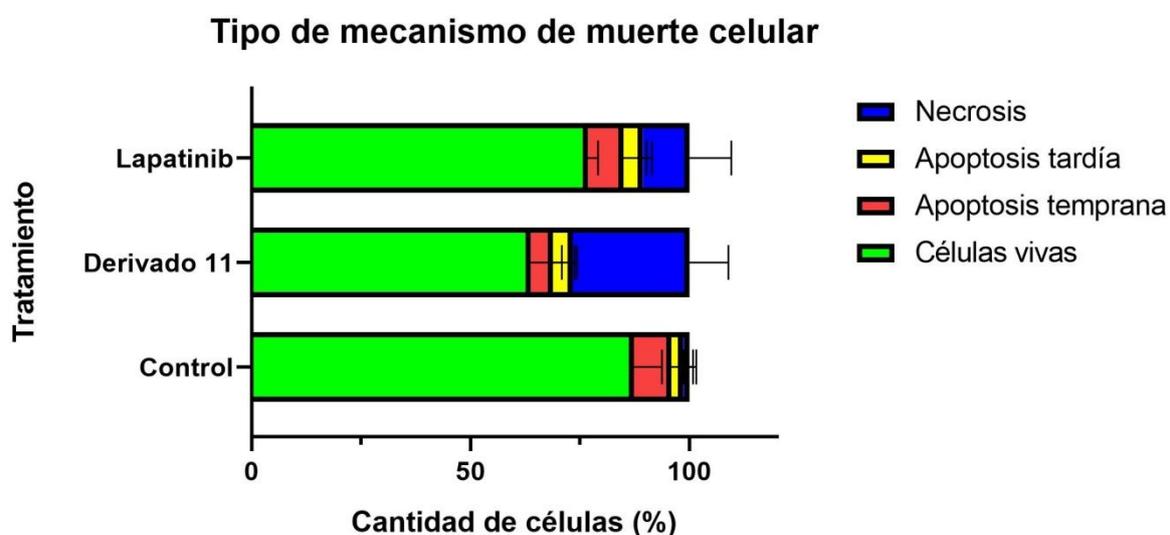
Por otro lado, de forma similar a lo que ocurre con la serie de sunitinib, tanto el derivado **11** como lapatinib, es probable que lleven a desencadenar el mismo perfil de muerte debido a que ambos compuestos comparten la subestructura de lapatinib, y en particular, el motivo 4-anilinoquinazolina, que le podría permitir a ambos compuestos interactuar con el bolsillo de unión de ATP presente en los receptores celulares tipo tirosina quinasa, determinando su actividad inhibitoria <sup>(69)</sup>.

---

(59). Skehan, P. *et al.* (1990). (69) Ju, Y. *et al.* (2018). Design and Evaluation of Potent EGFR Inhibitors through the Incorporation of Macrocyclic Polyamine Moieties into the 4-Anilinoquinazoline Scaffold. *J. Med. Chem.* 61(24):11372-11383.

También, es probable que la mayor toxicidad del derivado **11** sea consecuencia de la presencia de la subestructura carborano, el cual puede aumentar su afinidad por los blancos celulares con los cuales lapatinib ya puede interactuar, modificar la cinética de esta interacción así como también podría llevar a aumentar el espectro de receptores celulares con los cuales el compuesto **11** es capaz de interactuar e inhibir <sup>(66, 67)</sup>.

A continuación, en la *Figura 12* se muestra de forma cuantitativa, que el derivado **11** y lapatinib presentan un claro perfil necrótico. Si bien en las muestras tratadas tanto con el derivado **11** como con lapatinib también hay presencia de poblaciones apoptóticas, es importante destacar que las mismas no son estadísticamente diferentes a las presentes en la muestra control, y por lo tanto, es probable que no se encuentren presentes como consecuencia del tratamiento recibido.



*Figura 12.* Tipo de mecanismo de muerte celular desencadenado por el tratamiento con el derivado **11** de la serie de lapatinib y con lapatinib. Se muestran en un gráfico de barra los porcentajes de células correspondientes a cada población celular definida en el dot plot DAPI vs. FITC para cada muestra. Los porcentajes de células mostrados corresponden con el promedio de los porcentajes de los dos experimentos realizados, y son graficados junto con la desviación estándar como error. Al comparar las poblaciones de células de las muestras tratadas con el derivado **11** o con lapatinib respecto al control, se tiene que tanto para la muestra tratada con el derivado **11** como para la muestra tratada con lapatinib, la población necrótica no es significativamente diferentes a aquella de la muestra control a nivel de 0.050, obteniéndose los siguientes *p* valores de 0.129 y 0.451 respectivamente.

(66) Scholz, M. *et al.* (2011). (67) Issa, F. *et al.* (2011).

Si bien en la Figura 12 se reafirman las primeras observaciones sobre que frente al tratamiento con lapatinib o con el derivado **11** las células mueren mayoritariamente por necrosis, es relevante mencionar que existen antecedentes previos indicando que frente al tratamiento con lapatinib, las células tratadas sufren un proceso de autofagia. Estas células, al igual que la U87 MG, sobreexpresan EGFR <sup>(70)</sup>. Sin embargo, de existir una población de células que se encuentren sufriendo autofagia ante el tratamiento con lapatinib, no es detectable utilizando las tinciones aquí descriptas. Para hacerlo, es necesario utilizar el colorante naranja de acridina, el cual, cuando se encuentra en compartimentos ácidos como lo es el autofagosoma, emite luz fluorescente roja luego de ser excitado con luz azul <sup>(71, 72)</sup>. La cantidad de luz roja emitida permite cuantificar el volumen de compartimentos acídicos mediante citometría de flujo <sup>(72)</sup>. La población celular que es positiva para la tinción naranja de acridina se encuentra sufriendo un proceso de autofagia <sup>(70)</sup>. Por lo tanto, no se puede descartar la presencia de una población autofágica en la muestra tratada con lapatinib.

Otro hecho que es importante discutir es referido al porcentaje de células en proceso de morir que surgen de las Figuras 9 a 12. Las células U87 MG son tratadas con la IC<sub>50</sub> de los compuestos a evaluar. Sin embargo, el porcentaje total de células en proceso de morir tanto para la muestra tratada con el derivado **3**, con sunitinib o con el derivado **11** no se corresponde con el 50 % de células totales. Esto es debido también a diferencias entre la técnica de citometría de flujo y el método de SRB, tal y como se explica con anterioridad para explicar el porcentaje de células en proceso de morir evidenciadas por citometría de flujo en la muestra tratada con lapatinib. La gran diferencia radica en que por el método de SRB se considera como vivas a las células en proceso de morir, mientras que por citometría de flujo es posible diferenciarlas de aquellas que efectivamente están vivas. Por eso, es que es posible que en las muestras tratadas a la IC<sub>50</sub> de los compuestos no se evidencie un 50 % de células en proceso de morir.

---

(70) Chen, Y. J. *et al.* (2014). Lapatinib induces autophagic cell death and inhibits growth of human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 5(13), 4845. (71) Aoki, H. *et al.* (2007). Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol*, 72(1), 29-39. (72) Kanzawa, T. *et al.* (2003). Induction of Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Arsenic Trioxide. *Cancer Res*, 63, 2103–2108.

Por lo tanto, a modo de resumen de los experimentos de citometría de flujo se tiene que:

- tanto el derivado **3** como sunitinib cuando son evaluados a sus IC<sub>50</sub> por 24 horas, son capaces de desencadenar un proceso apoptótico en un cultivo de U87 MG
- tanto el derivado **11** como lapatinib cuando son evaluados a sus IC<sub>50</sub> por 24 horas, son capaces de desencadenar un proceso necrótico en un cultivo de U87 MG

En la bibliografía disponible, existe al menos tres descripciones previas para sunitinib <sup>(61, 73, 74)</sup> y una para lapatinib, donde se estudia el efecto que tienen a cierta dosis fija sobre un cultivo de células U87 MG, a través de ensayos de citometría de flujo utilizando las tinciones Anexina V-FITC y un colorante vital.

En el artículo publicado por *Giannopoulou, E. et al. (2010)* se describe que tanto sunitinib como lapatinib al ser evaluados a una concentración de 1 µM por 24 horas son capaces de inducir la apoptosis de cierta población celular, 87 % de las células se encuentran muriendo por apoptosis cuando son tratadas con sunitinib, mientras que el 32 % de las células se encuentran muriendo por apoptosis cuando son tratadas con lapatinib <sup>(61)</sup>.

Al comparar los resultados obtenidos en la presente tesina con esta descripción previa, se denotan similitudes y diferencias. Por un lado, existe concordancia en el hecho que el tratamiento con el fármaco sunitinib lleva al *onset* de apoptosis de gran parte de la población celular evaluada. Sin embargo, los resultados obtenidos para lapatinib son diferentes, obteniéndose en esta tesina que frente al tratamiento con lapatinib, las células U87 MG tienden a morir por un proceso necrótico, mientras que *Giannopoulou, E. et al (2010)* indican que las células U87 MG cuando son tratadas con lapatinib tienden a morir por un proceso apoptótico.

Estas discrepancias pueden deberse a que los compuestos evaluados para estudiar el mecanismo de muerte que desencadenan en células U87 MG en el trabajo de *Giannopoulou, E. et al (2010)*, se los disuelve en medio de cultivo sin complementar con FBS.

---

(61) Giannopoulou, E. et al. (2010). (73). Joshi, A. D. et al. (2012). Evaluation of Tyrosine Kinase Inhibitor Combinations for Glioblastoma Therapy. *PLoS One*, 7(10). (74). Fernandez-Fuente, G. et al. (2014). Culture dimensionality influences the resistance of glioblastoma stem-like cells to multikinase inhibitors. *Mol. Cancer Ther.*, 13(6), 1664-1672.

La privación de FBS lleva de por sí a la muerte celular en diferentes líneas celulares, como en particular ha sido descrito por Roth, W. *et al* (2000) para ciertas líneas de glioma <sup>(75-79)</sup>. Por lo tanto, el resultado final de muerte de las células cuando son tratadas con un determinado compuesto en condiciones de privación de suero se puede encontrar condicionado por la muerte provocada por la privación de suero en sí misma. Este hecho puede explicar los diferentes resultados obtenidos para el tipo de mecanismo de muerte celular desencadenado por lapatinib en células U87 MG determinado en la presente tesis y lo descrito en la bibliografía.

A continuación, se procede a realizar los experimentos de <sup>1</sup>H-RMN en vista de estudiar la capacidad de esta técnica para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular inducido por los diferentes compuestos en células de glioma U87 MG. Los tratamientos evaluados son los mismos que para los experimentos de citometría de flujo, es decir que se evalúa:

1. El derivado **3** de la serie de sunitinib a una dosis de 8  $\mu$ M durante 24 h
2. Sunitinib a una dosis de 32  $\mu$ M durante 24 h
3. El derivado **11** de la serie de lapatinib a una dosis de 10  $\mu$ M durante 24 h
4. Lapatinib a una dosis de 10  $\mu$ M durante 24 h

---

(75) Roth, W. *et al.* (2000). Bag-1 and Bcl-2 Gene Transfer in Malignant Glioma: Modulation of Cell Cycle Regulation and Apoptosis. *Brain Pathol*, 10(2), 223–234. (76) Lee, C.-K. *et al.* (2002). Inhibition of apoptosis in serum starved porcine embryonic fibroblasts. *Mol Reprod Dev*, 62(1). (77) Koo, H. (2002). High molecular weight water-soluble chitosan protects against apoptosis induced by serum starvation in human astrocytes. *J Nutr Biochem*, 13(4), 245–249. (78) Egeblad, M. *et al.* (2000). Cell death induced by TNF or serum starvation is independent of ErbB receptor signaling in MCF-7 breast carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 86(5), 617–625. (79) Kuzman, J. *et al.* (2005). Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 39(5), 841–844.

Como resultado de los ensayos de  $^1\text{H}$ -RMN, se obtienen los espectros de protón de cada una de las muestras. Para obtener información a partir de los mismos sobre el tipo de mecanismo de muerte celular sufrido por cada muestra, se analizan las siguientes señales:

- las señales correspondientes a los metilenos de los denominados lípidos móviles. Dichas señales han sido descritas como aquellas que se observan en el entorno al desplazamiento químico ( $\delta$ ) de 1.3 ppm. De acuerdo a lo discutido en la introducción, un aumento en la intensidad de este grupo de señales estaría relacionado con la puesta en marcha de un proceso apoptótico en condiciones *in vitro* <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>. En cambio, para células sufriendo un proceso de necrosis ha sido descrito que no hay cambios en las señales de los protones de los metilenos de los lípidos móviles <sup>(4, 12, 20)</sup> o que hay un sutil aumento en su intensidad <sup>(10)</sup>. Ciertos autores para cuantificar los cambios en la intensidad de estas señales realizan un cociente respecto a la integración de las señales correspondientes a los protones de los metilos, en la región de  $\delta$  0.9 ppm, de los lípidos móviles <sup>(10, 12, 19)</sup>.
- las señales correspondientes a las diferentes formas de colina presentes en la membrana. Dichas señales se encuentran en el entorno de 3.2 y 3.4 ppm. A diferencia de lo que sucede con el comportamiento de las señales de los protones de los metilenos de los lípidos móviles, existe gran controversia acerca del comportamiento de las señales asociadas a las diferentes formas de colina en relación a cada tipo de mecanismo de muerte. Por un lado, existe cierto consenso acerca que durante la apoptosis, existe una pequeña disminución en la intensidad de las señales de las diferentes formas de colina <sup>(4, 10-12, 19, 20, 24)</sup>. Por otro lado, relacionado con la necrosis, hay tanto descripciones que hacen referencia al aumento de la intensidad de tales señales <sup>(4)</sup> como a la completa abolición de las mismas <sup>(10, 12)</sup>.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997).

En vista de lo anterior, en la presenta tesina se resuelve:

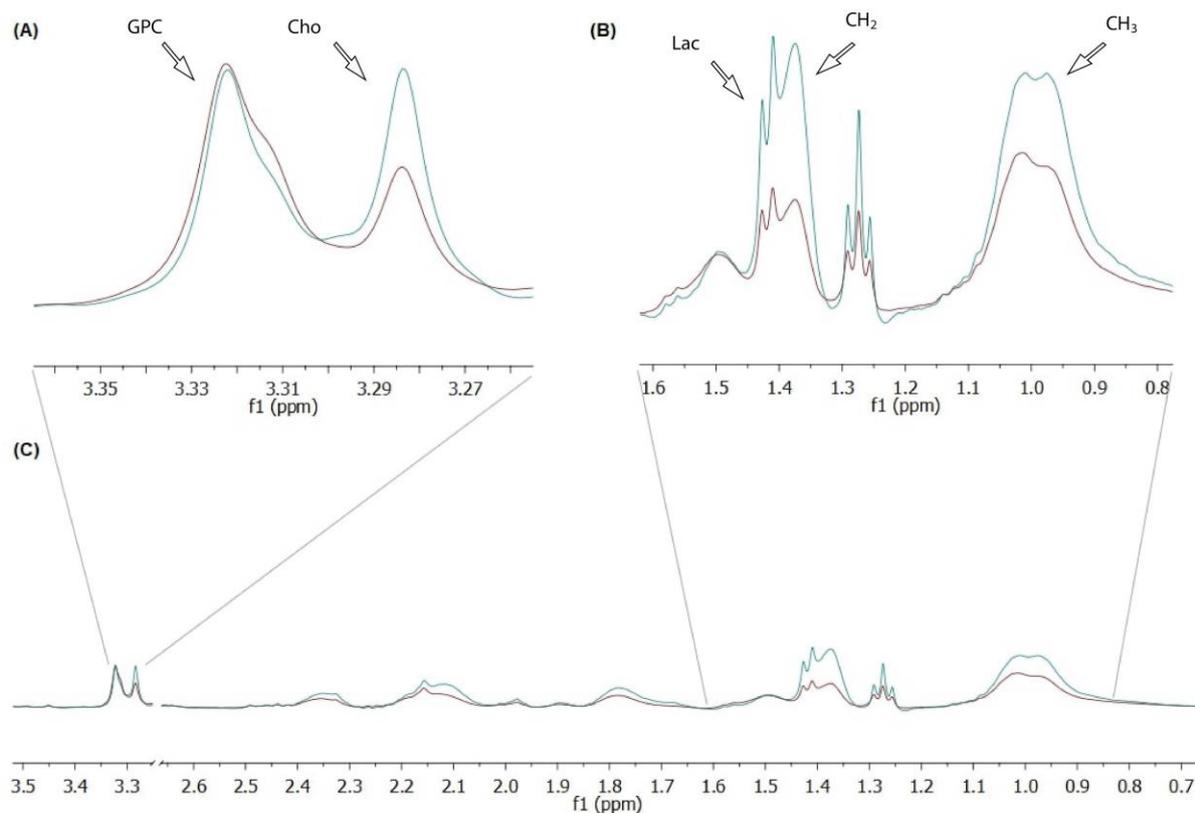
- seguir los cambios en la intensidad de las señales correspondientes a los protones de los metilenos de los lípidos móviles respecto a los cambios en la intensidad de las señales correspondientes a los protones de los metilos. Para ello, se integran las señales comprendidas entre 1.328 y 1.399 ppm y se realiza el cociente con las señales de los metilos de los lípidos móviles, integrando las señales comprendidas entre 0.800 y 1.152 ppm.
- seguir los cambios en la intensidad de las señales correspondientes a los protones de las siguientes formas de colina: por un lado de glicerofosfocolina (GPC) y por otro de metabolitos que contienen colina, como fosfocolina y colina (Cho) <sup>(4)</sup>. Para ello se analizan e integran las señales del espectro de protón de suspensiones celulares comprendidas entre 3.258 y 3.296 ppm, y entre 3.297 y 3.345 ppm, respectivamente. Se decide cuantificar los cambios en las señales de los protones de las diferentes formas de colina realizando un cociente entre las señales correspondientes de GPC respecto de las de Cho.

En ambos casos, los cocientes estudiados son corregidos por la cantidad de células presentes en el pellet correspondiente, ya que la intensidad de las señales observadas además de depender de características de la membrana asociadas a células vivas, sufriendo apoptosis o necrosis, también depende de la cantidad de células presentes, lo que determina cierta concentración de los componentes celulares en la muestra.

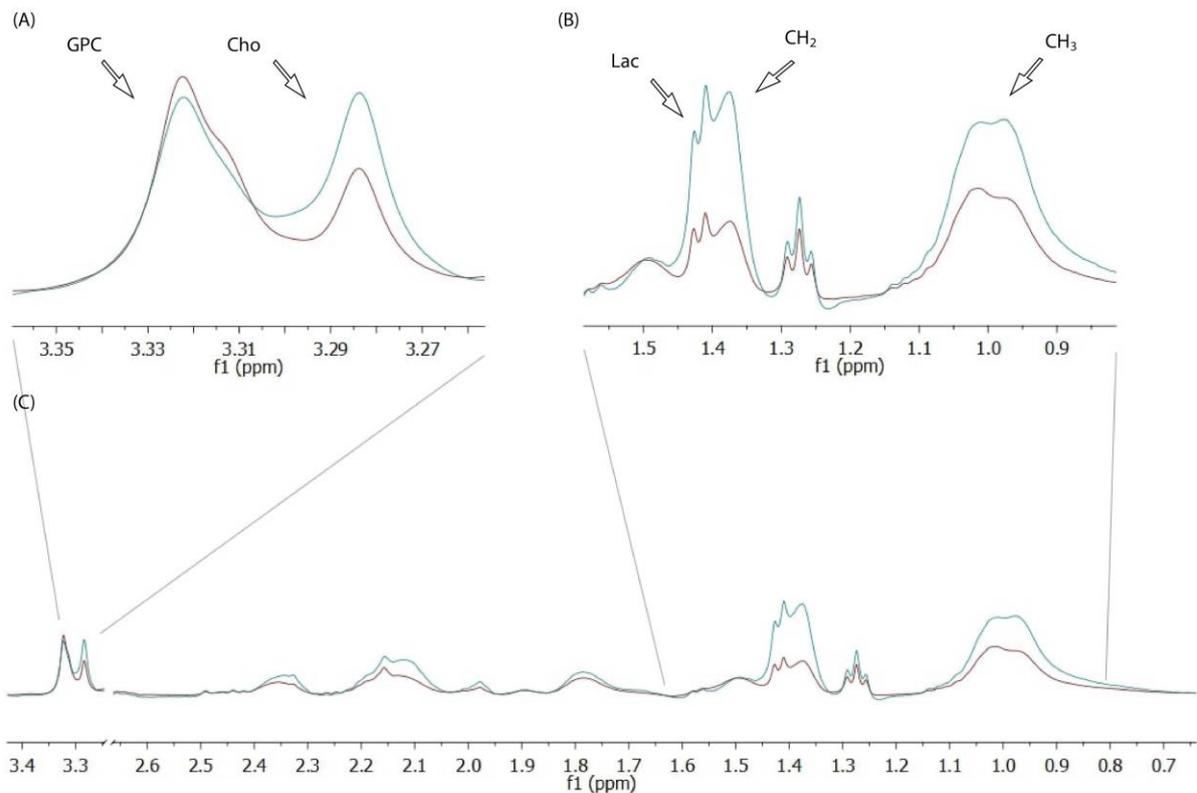
Los experimentos de <sup>1</sup>H-RMN se realizan por duplicado. A continuación, en las Figuras 13 a 16 se muestran las regiones de los espectros de protón obtenidos para cada una de las muestras para uno de estos experimentos, como ejemplo, siendo dicho experimento representativo de ambos experimentos realizados. Tales espectros se muestran superpuestos con el espectro de protón obtenido para la muestra control. La muestra control consiste de un pellet celular que ha sido tratado únicamente con una disolución de DMSO al 1 % por 24 horas.

---

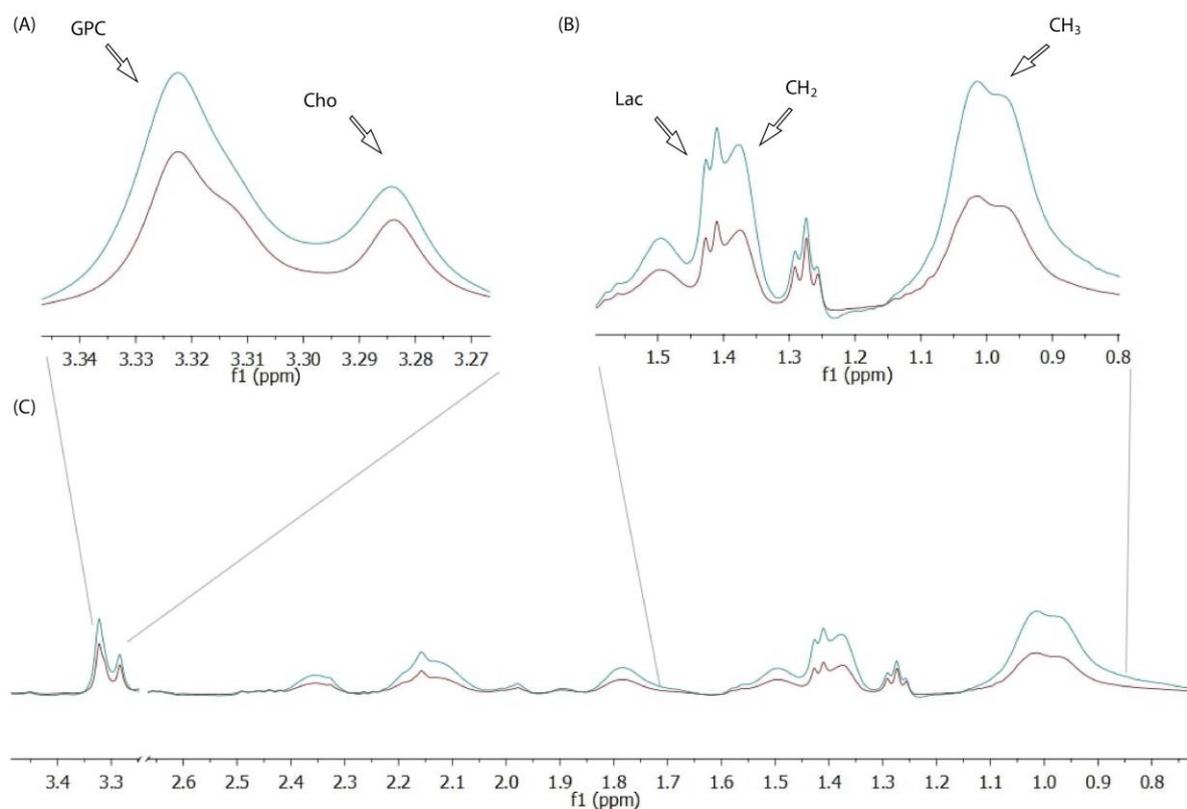
(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008).



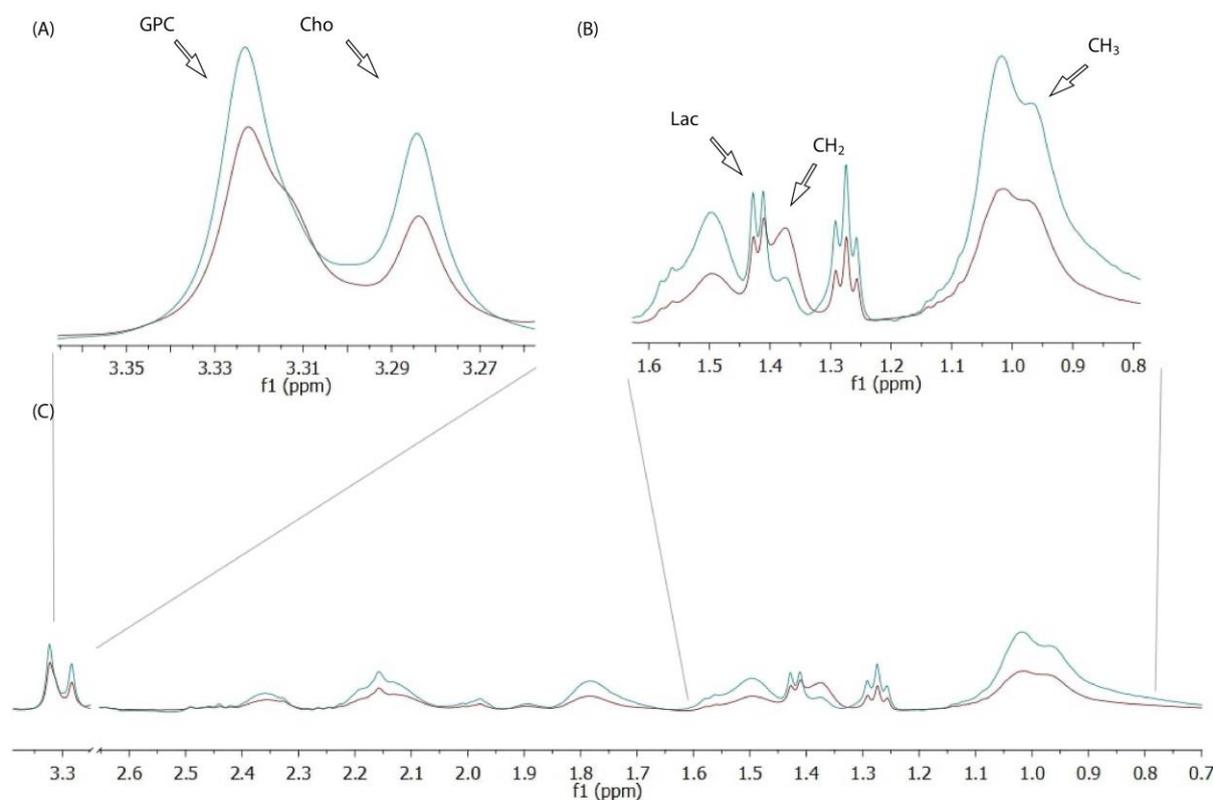
**Figura 13.** Región de estudio del espectro de resonancia magnética nuclear de protón obtenido para la muestra tratada con el derivado **3** de la serie de sunitinib (verde). Tal espectro se presenta superpuesto con el espectro de resonancia magnética nuclear de protón correspondiente a la muestra control (rojo). En la parte (A) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de las diferentes formas de colina, indicándose Cho y GPC. En la parte (B) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de los metilos y metilenos de los lípidos móviles, indicados como CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> respectivamente. También se indica la señal correspondiente a los protones metílicos del lactato, Lac. En la parte (C) se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón comprendido entre 0.7 ppm y 3.5 ppm, con un corte entre 2.65 y 3.25 ppm.



**Figura 14.** Región de estudio del espectro de resonancia magnética nuclear de protón obtenido para la muestra tratada con sunitinib (verde). Tal espectro se presenta superpuesto con el espectro de resonancia magnética nuclear de protón correspondiente a la muestra control (rojo). En la parte (A) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de las diferentes formas de colina, indicándose Cho y GPC. En la parte (B) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de los metilos y metilenos de los lípidos móviles, indicados como CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> respectivamente. También se indica la señal correspondiente a los protones metílicos del lactato, Lac. En la parte (C) se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón comprendido entre 0.7 ppm y 3.5 ppm, con un corte entre 2.65 y 3.25 ppm.



**Figura 15.** Región de estudio del espectro de resonancia magnética nuclear de protón obtenido para la muestra tratada con el derivado **11** de la serie de lapatinib (verde). Tal espectro se presenta superpuesto con el espectro de resonancia magnética nuclear de protón correspondiente a la muestra control (rojo). En la parte (A) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de las diferentes formas de colina, indicándose Cho y GPC. En la parte (B) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de los metilos y metilenos de los lípidos móviles, indicados como CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> respectivamente. También se indica la señal correspondiente a los protones metílicos del lactato, Lac. En la parte (C) se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón comprendido entre 0.7 ppm y 3.5 ppm, con un corte entre 2.65 y 3.25 ppm.



**Figura 16.** Región de estudio del espectro de resonancia magnética nuclear de protón obtenido para la muestra tratada con el compuesto lapatinib (verde). Tal espectro se presenta superpuesto con el espectro de resonancia magnética nuclear de protón correspondiente a la muestra control (rojo). En la parte (A) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de las diferentes formas de colina, indicándose Cho y GPC. En la parte (B) se muestra un *zoom* a la zona del espectro donde se encuentran las señales de los protones de los metilos y metilenos de los lípidos móviles, indicados como CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> respectivamente. También se indica la señal correspondiente a los protones metílicos del lactato, Lac. En la parte (C) se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón comprendido entre 0.7 ppm y 3.5 ppm, con un corte entre 2.65 y 3.25 ppm.

Observando las [Figuras 13 y 14](#), correspondientes a los espectros de protón de las muestras tratadas con el derivado **3** y su compuesto padre, sunitinib, respectivamente, se puede ver que:

- hay un aumento en la intensidad de las señales correspondientes a los protones de los metilos y metilenos de los lípidos móviles respecto a lo que sucede en el control. Si se observa detenidamente, se puede evidenciar que este aumento es mayor en el caso de las señales correspondientes a los protones de los metilenos de los lípidos móviles. El hecho que haya un mayor aumento en la intensidad de las señales correspondientes a los protones de los metilenos de los lípidos

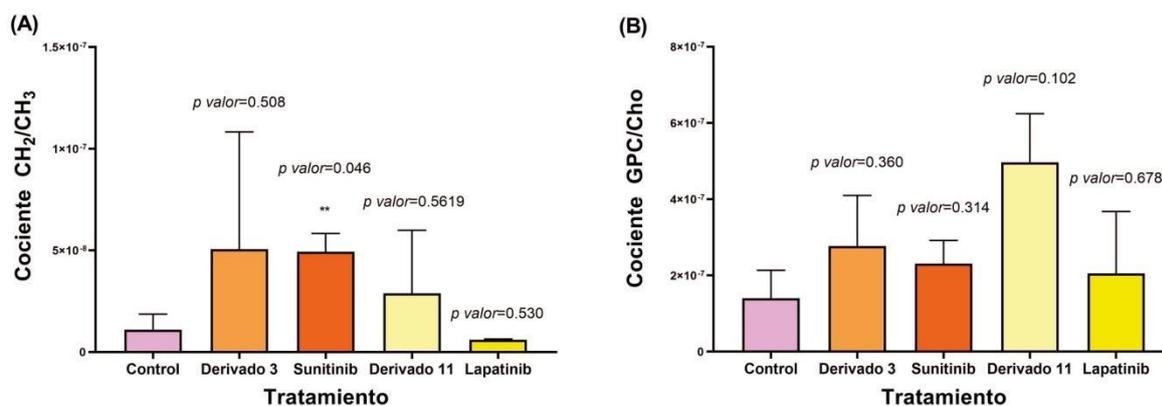
móviles, lleva a que haya un aumento en el cociente entre la integración de esta señal y la correspondiente a las señales de los protones de los metilos de los lípidos móviles respecto a lo que sucede en el control.

- hay un aumento en la intensidad de la señal correspondiente a Cho, mientras que la señal correspondiente a GPC se mantiene invariante respecto al control. Esto lleva a que un perfil diferencial respecto al control.

En cambio, observando las Figuras 15 y 16, correspondientes a los espectros de protón de las muestras tratadas con el derivado **11** y su compuesto padre, lapatinib, respectivamente, se puede ver que hay otro patrón de modificación de señales:

- para el derivado **11** también se observa un aumento en la intensidad de las señales correspondientes a los protones de los metilos y metilenos de los lípidos móviles respecto a lo que sucede en el control. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con sunitinib y su derivado **3** se puede evidenciar que este aumento para el derivado **11** parece ser en igual medida tanto para las señales correspondientes a los protones de los metilenos como de metilos de los lípidos móviles. Esto lleva a que no haya variación en el cociente entre la integración de ésta señal y la correspondiente a las señales de los protones de los metilos de los lípidos móviles respecto a lo que sucede en el control. Por otro lado, para lapatinib el incremento es mayor para los protones metílicos de los lípidos móviles.
- pareciera haber un pequeño aumento concomitante en la intensidad de las señales de los protones de Cho y GPC. Esto llevaría a que no haya cambios en el cociente de la integración de las señales de los protones de GPC y Cho respecto al control.

De forma tal de poder evaluar cuantitativamente estos cambios en la intensidad de señales de protones de moléculas componentes de membrana celular, se realizan los cocientes correspondientes y se generan los gráficos de barras. Se grafican los cocientes de la integración de la señal de los protones de los metilenos de los lípidos móviles y la señal de los protones de los metilos de los lípidos móviles para todas las condiciones ensayadas. Se realiza también un gráfico análogo para los cocientes de la integración de la señal de los protones de GPC y de Cho. Los gráficos de barras resultantes se muestran en la Figura 17. Aquellas muestras que sean estadísticamente diferentes del control ( $p < 0.050$ ) se encuentran señaladas con asteriscos.



**Figura 17.** Análisis cuantitativo de los cambios en el espectro de protón de las diferentes condiciones ensayadas. Aquellas muestras que son estadísticamente diferentes del control,  $p < 0.050$ , se encuentran señaladas con doble asterisco. Los  $p$  valores correspondientes a cada muestra son presentados sobre la barra correspondiente. En la parte A de la figura se grafica el promedio de los cocientes de la integración de las señales correspondientes a los protones de los metilenos de los lípidos móviles, respecto de la integración de las señales correspondientes a los protones de los metilos de los lípidos móviles, junto con la desviación estándar, para cada condición ensayada. En la parte B de la figura se grafica el promedio de los cocientes de la integración de las señales correspondientes a los protones de GPC, respecto de la integración de las señales correspondientes a los protones de Cho, junto con la desviación estándar, para cada condición ensayada.

A partir de los resultados presentados en la [Figura 17](#) se puede afirmar que, aquellas tendencias cualitativas de cambios observados en los espectros de protón ilustrados en las [Figuras 13 a 16](#) son matemáticamente, aunque en algunos casos estadísticamente no representativos, confirmados. Las muestras que han sido tratadas con sunitinib, a su IC<sub>50</sub> por 24 horas, muestra un aumento del cociente CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> estadísticamente significativo respecto del correspondiente cociente del control. En el resto de los casos, el hecho de que las tendencias iniciales de cambios observados no hayan resultado ser estadísticamente diferentes cuando son comparados con el control puede deberse a varias razones. En primer lugar, el experimento de <sup>1</sup>H-RMN ha sido repetido únicamente dos veces. Es probable que sea necesario realizarlo más veces para de esta forma poder confirmar o refutar las tendencias a cambios observadas en estos dos experimentos iniciales.

Por otro lado, los cambios observados en la intensidad de las señales de los protones visibles mediante <sup>1</sup>H-RMN de suspensiones celulares, se asocian a cambios en parámetros fisicoquímicos que sufren las membranas celulares cuando atraviesan un proceso biológico, como por ejemplo lo es la apoptosis o la necrosis <sup>(4, 10-24)</sup>.

Sin embargo, estos cambios en la viscosidad y fluidez de membrana, así como de exposición de ciertos componentes celulares, no son específicos de los procesos de muerte en general ni tampoco lo son de cada tipo de mecanismo de muerte <sup>(2, 6-9, 25, 30)</sup>. A modo de ejemplo, en la introducción se menciona el hecho que se han observado cambios en la intensidad de las señales de los lípidos móviles asociadas a la proliferación celular <sup>(30)</sup>. Entonces, es posible que exista una gran variabilidad de resultados entre diferentes experimentos producto de que son muchas las variables que pueden influir en la viscosidad, fluidez y composición de membrana, sumadas a un proceso de muerte celular llevándose a cabo. Estas variables van más allá de aquellas que se pueden controlar al trabajar con células provenientes de un mismo ancestro y del mismo pasaje, así como utilizar las mismas condiciones de cultivo, ya que las células tumorales presentan una alta tasa de mutación, las cuales suceden al azar y pueden repercutir de muchas maneras diferentes a las propiedades de la membrana celular. Quizás, al aumentar el número de experimentos realizados, éstas diferencias inherentes a las células no vinculantes de forma directa con la muerte celular, puedan ser compensadas entre diferentes experimentos y así obtener valores de cambios en las señales de los espectros de protón estadísticamente representativos.

Un tercer motivo es la presencia, en la región de los metilenos de lípidos móviles, de señales correspondientes al metabolito lactato (Lac, doblete que aparece en el entorno de  $\delta$  1.4 ppm, Figuras 13 a 16). La señal de este metabolito, que es excretado por las células U87 MG y que queda adherido al pellet de células o es liberado durante el experimento de <sup>1</sup>H-RMN, resulta ser un artefacto en el momento de determinar la integración de los metilenos <sup>(80)</sup>. La liberación de lactato por parte de células tumorales se asocia con su malignidad, y de acuerdo a la bibliografía consultada, no existe consenso acerca de que exista un comportamiento diferencial del mismo asociado a la apoptosis o a la necrosis <sup>(4, 12, 80)</sup>.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (80) Mongersun, A. *et al.* (2016). Droplet Microfluidic Platform for the Determination of Single-Cell Lactate Release. *Anal Chem*, 88(6):3257-63.

Sin embargo, hay quienes incluyen dicha señal en la integración correspondiente a los protones de los metilenos de los lípidos móviles <sup>(12, 17, 18)</sup>. En la presente tesina de grado, no se realiza lo anterior, debido a que no se considera correcto considerar la señal de dichos protones como parte del conjunto de señales de protones consecuencia de los metilenos de los lípidos móviles. De todas formas, debido a la superposición de las señales de Lac y las de los protones de los metilenos de los lípidos móviles, no es posible evitar considerar parte de la señal Lac en la integración de los CH<sub>2</sub>. Por lo tanto, es probable que dicho artefacto contribuya a que los cambios observados en los espectros de protón de las diferentes muestras no sean estadísticamente diferentes a la muestra control.

A pesar de no haberse obtenido cambios estadísticamente significativos para casi ninguna de las señales analizadas en cada una de las muestras estudiadas por <sup>1</sup>H-RMN, con excepción del aumento en el cociente CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> para la muestra tratada con sunitinib, se decide continuar con el análisis de tales cambios, considerando que los mismos representan tendencias a confirmar.

Comenzando el análisis con la serie de sunitinib, es evidente que existe un aumento en el cociente CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> en las muestras tratadas con el derivado **3** de la serie de sunitinib o con sunitinib respecto al control (ver Figura 17). Un aumento en la intensidad de la señal de los protones de los metilenos de los lípidos móviles en condiciones tratadas respecto a una condición control se asocia con la puesta en marcha de un proceso apoptótico <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>. Por lo tanto, los resultados obtenidos para cambios en el cociente CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> en las muestras tratadas con el derivado **3** de la serie de sunitinib o con sunitinib están indicando la presencia de una población apoptótica en dichas muestras. Este resultado es coincidente con los resultados de citometría de flujo.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997).

Respecto al comportamiento de los metabolitos relacionados con colina, se puede ver que tanto aquellas células tratadas con el derivado **3** como con sunitinib, presentan un cierto aumento, no estadísticamente significativo, en el cociente GPC/Cho (*Figura 17*). De acuerdo a la bibliografía consultada, un descenso en la intensidad de las señales asociadas a los metabolitos de colina se encuentra asociado a la puesta en marcha de un proceso apoptótico <sup>(4, 10-12, 19, 20, 24)</sup>. Respecto a estos antecedentes se debe de tener en cuenta varias cosas:

- por un lado, estas conclusiones son obtenidas a partir de una cuantificación absoluta de la intensidad de las señales asociadas a diferentes formas de colina, comparando los resultados obtenidos respecto al control <sup>(4, 10-12, 19, 20, 24)</sup>, a diferencia de la cuantificación propuesta en la presente tesina de grado de cuantificar las diferencias en el comportamiento de las diferentes formas de colina a través de un cociente entre las señales GPC/Cho.
- por otro lado, las descripciones previas que dan cuenta de cambios en el comportamiento de las señales asociadas a colina no siempre se rigen por las mismas señales. A modo de ejemplo, hay quienes únicamente siguen la señal asociada a metabolitos de colina, como fosfocolina y colina, en el entorno de 3.2 ppm <sup>(10, 19)</sup>, mientras que hay quienes siguen dicha señal junto con la señal correspondiente a glicerofosfocolina <sup>(11, 12, 20, 24)</sup> sin realizar una distinción entre dichas señales y analizando su comportamiento como un todo.

Por lo tanto, en vista de lo anterior, es difícil realizar una hipótesis acerca del comportamiento del cociente GPC/Cho analizado en la presente tesina relacionado con la apoptosis, con la información presente en la bibliografía.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997).

De forma tal de poder establecer tal hipótesis, se toma en cuenta un análisis exhaustivo de las señales presentes en el espectro de protón de RMN realizado por *Rainaldi, G. et al (2008)*. En dicho artículo, analizan las señales Cho y GPC por separado, realizando una cuantificación absoluta respecto al control para evaluar el comportamiento de las mismas en células apoptóticas y en células necróticas. Los autores describen que hay un descenso significativo en la intensidad de la señal Cho en células apoptóticas comparado con el control, mientras que hay un aumento en la intensidad de la señal GPC, aunque dicho resultado es dependiente del estímulo utilizado para inducir apoptosis en células <sup>(4)</sup>. Por lo tanto, tomando en cuenta lo descrito por *Rainaldi, G. et al (2008)* se puede hipotetizar que, en células apoptóticas se puede esperar un aumento en el cociente GPC/Cho.

Al contrastar la hipótesis anteriormente planteada acerca del comportamiento GPC/Cho en relación a la apoptosis, con los resultados aquí obtenidos se puede ver que pareciera haber coincidencia entre el comportamiento del cociente GPC/Cho en las muestras con aquel hipotetizado. En concreto, para las muestras tratadas con el derivado **3** o con sunitinib, las cuales de acuerdo a los cambios en el cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , y citometría de flujo, están muriendo mayoritariamente por un proceso apoptótico, presentan un aumento en el cociente GPC/Cho. Sin embargo, como se discute más adelante, el comportamiento de los metabolitos relacionados con colina durante la muerte celular parece ser complejo y diverso.

Siguiendo con el análisis de los resultados, en los experimentos realizados en la presente tesina se observa, en primer lugar una cierta tendencia de que las señales de los protones de los lípidos móviles no sufren mayores cambios en aquellas células que han sido tratadas con el derivado **11** o con lapatinib. Luego, al realizar un análisis cuantitativo de las modificaciones en el espectro de protón de las muestras tratadas con el derivado **11** o con lapatinib respecto a la condición control, se observa en la Figura 17 que:

- por un lado, aquellas células que han sido tratadas con el derivado **11** presentan un leve aumento, que no es estadísticamente significativo, en el cociente entre la integración de las señales de los protones de los metilenos y los metilos de los lípidos móviles.

---

(4) Rainaldi, G. et al (2008).

- mientras que, por otro lado, aquellas células que han sido tratadas con lapatinib no presentan cambios, respecto al control, en el cociente entre la integración de las señales de los protones de los metilenos y los metilos de los lípidos móviles.

Al ser estos resultados no-diferentes, estadísticamente, al control, se puede inducir que en principio los dos compuestos inducen la muerte celular de forma similar, coincidente con los resultados de citometría de flujo, sobretodo mediante un proceso necrótico provocan los mismos cambios en el espectro de protón sobre las señales de los metilenos y metilos móviles. Este tipo de cambios observados han sido previamente descritos como asociados a procesos necróticos <sup>(4, 10, 12, 20)</sup>.

El hecho que no haya consenso acerca de qué sucede con el comportamiento de las señales de los protones asociadas a los metilenos y metilos de los lípidos móviles en células sufriendo un proceso necrótico no es necesariamente sorprendente. Tal y como se nombra con anterioridad en esta sección, son muchos los procesos que pueden estar afectando el comportamiento de las señales visibles en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN: por ejemplo cambios en el comportamiento de las señales dadas por los metilos y metilenos de los lípidos móviles pueden deberse a procesos tales como el estado proliferativo de las células así como procesos de muerte celular <sup>(4, 10-24, 30)</sup>. Relacionado a procesos de muerte celular, en la introducción se mencionan tres mecanismos principales de muerte celular: la apoptosis, la necrosis y la autofagia <sup>(1-3)</sup>. Sin embargo, en la bibliografía consultada sobre estudios del tipo de mecanismo de muerte celular por <sup>1</sup>H-RMN no se tiene en cuenta el hecho que la autofagia puede estar actuando como mecanismo de muerte celular en las células evaluadas y estar interfiriendo con el análisis de resultados realizado.

Como se establece en la introducción, se cree que los lípidos móviles que dan lugar a señales características en el espectro de protón pueden formar parte de microdominios de membrana celular o de cuerpos lipídicos intracelulares <sup>(16, 23, 30, 37, 38)</sup>.

---

(1) Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (14) Ronen, S. M. *et al.* (1999). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (16) Hakumäki, J. M. *et al.* (2000). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (21) Lutz, N. W. *et al.* (2003). (22) Nunn, A. V. *et al.* (1996). (23) Di Vito, M. *et al.* (2001). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (30) Barba, I. *et al.* (1999). (37) Iorio, E. *et al.* (2003). (38) Brisdelli, F. *et al.* (2003).

Los cambios en el comportamiento de las señales de los lípidos móviles visibles por  $^1\text{H}$ -RMN pueden deberse tanto a cambios en su movilidad, su entorno electrónico así como por su acumulación <sup>(16)</sup>. Muchos factores diferentes pueden contribuir a la acumulación de cuerpos lipídicos, y por lo tanto, llevar a la acumulación de lípidos móviles, todos ellos afectando el recambio de estos organelos <sup>(16, 81)</sup>. El recambio de los cuerpos lipídicos se encuentra relacionado al estado metabólico de la célula. De forma más directa, el crecimiento o consumo de cuerpos lipídicos se encuentra asociado a la autofagia <sup>(81, 82)</sup>. Por lo tanto, no se puede descartar el hecho que la autofagia, como mecanismo de muerte celular, se pueda estar desarrollando en las células tratadas y estar interfiriendo en el comportamiento de las señales de los lípidos móviles en el espectro de protón, dificultando su interpretación relacionado a un tipo de mecanismo de muerte celular dado.

En vista de todo lo anterior, y teniendo en cuenta descripciones previas donde se ha demostrado que lapatinib es capaz de inducir autofagia en células de mamífero que sobreexpresan EGFR <sup>(70)</sup>, es posible que en parte el comportamiento diferencial entre las muestras tratadas con el derivado **11** y con lapatinib para las señales en el espectro de protón asociadas a los lípidos móviles, se pueda explicar al hecho que las células tratadas con lapatinib pueden estar sufriendo autofagia además de necrosis.

Respecto al comportamiento de los metabolitos relacionados con colina, tanto en la muestra tratada con el derivado **11** como aquella tratada con lapatinib, hay un cierto aumento en el cociente GPC/Cho, aunque en aquellas células tratadas con lapatinib, el aumento es menor. De forma similar al análisis realizado para el comportamiento del cociente GPC/Cho en las muestras tratadas con el derivado **3** o con sunitinib, se toma como base los cambios observados por *Rainaldi, G. et al (2008)* en los metabolitos relacionados con colina para hipotetizar acerca de qué sucede con el comportamiento del cociente GPC/Cho en células necróticas. En dicho artículo, notan un aumento significativo en la intensidad de tanto la señal Cho como GPC para células necróticas, en niveles similares entre sí <sup>(4)</sup>. Por lo tanto, se puede esperar que no haya cambios en el cociente GPC/Cho para células necróticas.

---

(4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (16) Hakumäki, J. M. *et al.* (2000). (70) Chen, Y. J. *et al.* (2014). (81). Olzmann, J. A. *et al.* (2018). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(3), 137–155. (82) Kaini, R. R. *et al.* (2012). Autophagy regulates lipolysis and cell survival through lipid droplet degradation in androgen-sensitive prostate cancer cells. *The Prostate*, 72(13), 1412-1422.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en la muestra de células tratadas con el derivado **11**, se observa un aumento en el cociente GPC/Cho, en lugar de no observarse cambios respecto al control. Lo mismo sucede con la muestra de células tratadas con lapatinib. Las diferencias entre los resultados obtenidos para el cociente GPC/Cho para las muestras tratadas con el derivado **11** o con lapatinib respecto a lo que se esperaría obtener para muestras con células necróticas, se pueden deber también a varias razones. En primer lugar, nuevamente el hecho que los resultados obtenidos en la presente tesina no son estadísticamente representativos, puede estar incidiendo en que las tendencias observadas inicialmente no resulten ser tales. Esto puede ser relevante especialmente ya que para la muestras tratadas con el derivado **11** o con lapatinib se puede observar que existe una dispersión en los datos (ver *Figura 17, parte B*).

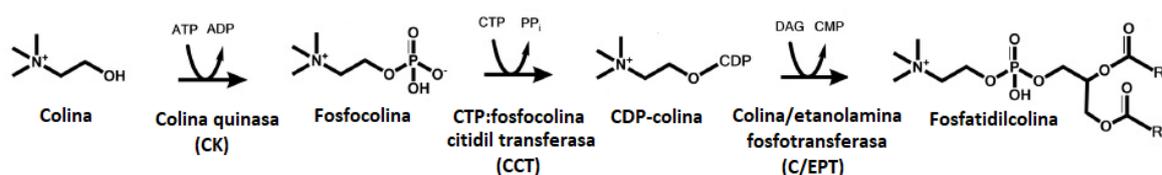
Sin embargo, más allá de ello, el comportamiento de las diferentes formas de la colina en relación a la muerte celular no parece estar asociado a un tipo de mecanismo de muerte en particular: notar que se ha obtenido el mismo comportamiento en el cociente GPC/Cho tanto para muestras donde parece haber presencia de una población apoptótica (muestras tratadas con el derivado **3** o con sunitinib) o necrótica (muestras tratadas con derivado **11** o con lapatinib).

De acuerdo a la bibliografía consultada, el balance entre la síntesis y la degradación de la fosfatidilcolina es de suma importancia para la regulación del ciclo celular: desbalances en la homeostasis de fosfatidilcolina pueden llevar a la detención en el crecimiento celular y a la muerte celular. Si bien está establecido que el descenso de la cantidad de fosfatidilcolina se encuentra asociado con la muerte celular por apoptosis, el efecto de la apoptosis sobre los diferentes intermedios sintéticos de la fosfatidilcolina así como sobre sus productos de degradación es variable y dependiente tanto de la forma en que la apoptosis se induce y de la línea celular en estudio <sup>(83, 84)</sup>. Algo similar sucede con la muerte celular por necrosis: resultados previos del grupo en otro modelo eucariota muestran que los cambios en la región de la colina del espectro de protón varían de acuerdo al estímulo utilizado para inducir la muerte celular <sup>(85, 86)</sup>.

---

(83) Cui, Z. *et al.* (2002). Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1585(2-3), 87-96. (84) Ridgway, N. D. (2013). The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Crit Rev Biochem Mol*, 48(1), 20-38. (85) Benítez, D. *et al.* (2012). Study of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell death by NMR-visible mobile lipid analysis. *Parasitol*, 139(4), 506-515. (86) Benítez, D. *et al.* (2014). Initial studies on mechanism of action and cell death of active *N*-oxide-containing heterocycles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. *Parasitol*, 141(5), 682-696.

En eucariotas, la homeostasis de fosfatidilcolina está controlada por un balance entre su síntesis y degradación. Existen dos vías biosintéticas de la fosfatidilcolina: la vía CDP-colina y la vía de metilación de fosfatidiletanolamina. Sin embargo, esta última se encuentra presente fundamentalmente en células hepáticas y por lo tanto, no es relevante en esta discusión. La vía CDP-colina está comprendida por tres enzimas que actúan de forma concatenada: la colina quinasa actúa sobre la colina, obteniéndose fosfocolina, producto sobre el cual actúa la CTP:fosfocolina citidil transferasa, convirtiendo la fosfocolina en CDP-colina, la cual finalmente es sustrato de colina fosfotransferasa, la cual cataliza la síntesis de fosfatidilcolina, utilizando como co-sustrato diacilglicerol (*Figura 18*)<sup>(83, 84)</sup>.



**Figura 18.** Esquema de la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina: la vía CDP colina. Abreviaturas: ATP = adenosina trifosfato, ADP = adenosina bifosfato, CTP = citidina trifosfato, PP<sub>i</sub> = pirofosfato inorgánico, DAG = diacilglicerol.

(83) Cui, Z. *et al.* (2002). (84) Ridgway, N. D. (2013).

En cuanto a la degradación de la fosfatidilcolina, existen varias enzimas, muchas de ellas fosfolipasas, que son capaces de hidrolizar a la fosfatidilcolina para dar intermedios de su vía sintética, como colina y fosfocolina, así como glicerofosfocolina. En particular, la degradación de fosfatidilcolina a glicerofosfocolina es catalizada por las enzimas fosfolipasa A 1 y 2, así como por la fosfolipasa B. La glicerofosfocolina, además de ser un producto de degradación de la fosfatidilcolina es un importante regulador osmótico <sup>(84)</sup>. Además, la fosfatidilcolina es sustrato de otro conjunto de enzimas, las cuales a partir de ella generan compuestos mediadores de vías de señalización celular como el ácido araquidónico y el ácido fosfatídico <sup>(83)</sup>.

Entonces, retomando lo anteriormente mencionado, es cierto que se asocia una baja en la fosfatidilcolina a la apoptosis. Sin embargo, lo que sucede respecto al comportamiento del resto de los metabolitos relacionados con ella es muy variable, dependiendo a qué nivel de la vía sintética o de las enzimas capaces de metabolizarla se actúa. A modo de ejemplo, existen moléculas, como el hemicolinio-3 o el farnesol, que son capaces de inhibir a diferentes enzimas de la vía sintética de la fosfatidilcolina: el hemicolinio-3 es un inhibidor de la colina quinasa y el farnesol lo es de la colina fosfotransferasa. Por lo tanto, provocan la acumulación y depleción de metabolitos diferentes, aunque ambos compuestos inducen apoptosis en las células <sup>(83, 84)</sup>. Además, existen moléculas capaces de afectar la homeostasis de fosfatidilcolina sin necesariamente ser inhibidores de la vía biosintética de la misma. La enzima fosfolipasa A1 es sustrato de la enzimas caspasa 3, enzima que se activa en un contexto apoptótico. Una vez escindida por la caspasa 3, la fosfolipasa A1 se vuelve una enzima más activa, lo que lleva a la degradación de la fosfatidilcolina a glicerofosfocolina, lo que lleva a la baja de fosfatidilcolina en un contexto apoptótico <sup>(84)</sup>.

Por lo tanto, el comportamiento de las concentraciones de glicerofosfocolina, fosfocolina y colina es muy variable durante la apoptosis, y es totalmente dependiente del mecanismo de acción del compuesto que induce la muerte celular. En consecuencia, lo establecido en la bibliografía acerca de que las señales correspondiente a metabolitos relacionados con colina como fosfocolina y colina, y en algunos casos glicerofosfocolina, se ven disminuidas en intensidad en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN durante un proceso apoptótico, puede que no se cumpla en todos los casos, dado que el comportamiento de tales metabolitos depende de cómo la apoptosis fue inducida en la célula <sup>(83, 84)</sup>.

---

(83) Cui, Z. *et al.* (2002). (84) Ridgway, N. D. (2013).

Respecto a la necrosis, en la bibliografía consultada no existe un estudio exhaustivo acerca de la relación entre la puesta en marcha de un proceso necrótico y los cambios en la homeostasis de la fosfatidilcolina en células de mamífero. Sin embargo, se hace notar que existen estudios donde se evalúa la muerte celular desencadenada por desregulación en la homeostasis de la fosfatidilcolina sin distinción acerca de cuál mecanismo en particular se trata. Por lo tanto, no se puede descartar que un desbalance en la concentración de fosfatidilcolina pueda llevar también a la muerte por necrosis <sup>(83)</sup>. Además, en estudios previos del grupo se describen cambios en la región de colina en el espectro de protón según el estímulo que provoca la necrosis en otro modelo eucariota, lo que permite afirmar que durante la necrosis el metabolismo de las diferentes formas de colina estaría afectado <sup>(85, 86)</sup>.

En relación a esto, *Rainaldi, G. et al (2008)* establece que la glicerofosfocolina podría ser indicativo de daño a nivel de membrana, debido a que se trata de un producto de degradación de la fosfatidilcolina, fosfolípido de gran representación a nivel de membrana. Este autor propone, entonces, que en células necróticas dicho producto de degradación estaría aumentado, como consecuencia de la pérdida de integridad de membrana que sucede como consecuencia de la necrosis <sup>(1-4, 6, 8, 9)</sup>. Además, *Rainaldi, G. et al (2008)* sugiere que aumentos observados para metabolitos como la taurina en células necróticas puede deberse al rol que los mismos cumplen en la osmorregulación y su aumento da cuenta del desbalance hidrolítico observado en células necróticas <sup>(1-4)</sup>. Como se menciona antes en la discusión, la glicerofosfocolina es un importante regulador osmótico <sup>(84)</sup>. Entonces, la observación realizada por *Rainaldi, G. et al (2008)* que en células necróticas hay un aumento en los niveles de glicerofosfocolina también es compatible con la desregulación osmótica observada en células necróticas.

En vista de todo lo anterior, si bien de acuerdo a los resultados publicados por *Rainaldi, G. et al (2008)* se esperaría obtener un cociente GPC/Cho igual entre células en necrosis y células vivas, no es ilógico observar en cambio un aumento de dicho cociente, considerando el hecho que la glicerofosfocolina se trata de un producto de degradación de la fosfatidilcolina y por su rol osmorregulador.

---

(1) Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Givan, A. L. (1992). (83) Cui, Z. *et al.* (2002). (84) Ridgway, N. D. (2013). (85) Benítez, D. *et al.* (2012). (86) Benítez, D. *et al.* (2014).

Por último, el comportamiento del cociente GPC/Cho de aquella muestra de células tratadas con lapatinib debe recibir especial atención. Como se ha comentado con anterioridad, la muestra tratada con lapatinib debe ser analizada con cautela, debido a las descripciones previas de la capacidad de dicho compuesto de inducir autofagia <sup>(70)</sup>. Durante la autofagia, se requiere la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina para la formación y mantención del autofagosoma. Para ello, la enzima CTP:fosfocolina citidil transferasa se encuentra activa durante la autofagia, llevando a la mayor síntesis de fosfatidilcolina <sup>(87)</sup>.

Por lo tanto, si las células tratadas con lapatinib están sufriendo un proceso de autofagia, además de un proceso necrótico, el mismo se encuentra afectando la homeostasis de la fosfatidilcolina. Por lo tanto, los balances entre los diferentes metabolitos relacionados con fosfatidilcolina se encuentran afectados.

En vista de todo lo anterior, se hace evidente que el comportamiento del cociente GPC/Cho no parece estar directamente asociado a un tipo de mecanismo de muerte celular, ya que tanto muestras donde hay células apoptóticas (tratadas con el derivado **3** o con sunitinib) como donde hay células necróticas (tratadas con el derivado **11** o con lapatinib) se observan cambios similares en dicho cociente (Figura 17, parte B). De acuerdo a la información disponible al momento, los cambios en los niveles de colina, fosfocolina y fosfatidilcolina varían de acuerdo a la forma de inducir la muerte celular y según la línea celular en estudio <sup>(83, 84, 85, 86)</sup>. Además, otros procesos celulares como la autofagia, también repercuten en la homeostasis de las diferentes formas de colina <sup>(87)</sup>. Por lo tanto, el comportamiento del cociente GPC/Cho o de las señales individuales en principio no permite predecir qué tipo de mecanismo de muerte celular se ha inducido en las células en estudio, pero su análisis puede revelar información importante acerca del mecanismo de acción del agente inductor de la muerte celular.

---

(70) Chen, Y. J. *et al.* (2014). (83) Cui, Z. *et al.* (2002). (84) Ridgway, N. D. (2013). (85) Benítez, D. *et al.* (2012). (86) Benítez, D. *et al.* (2014). (87) Andrejeva, G. *et al.* (2019). De novo phosphatidylcholine synthesis is required for autophagosome membrane formation and maintenance during autophagy. *Autophagy*, 1-17.

De forma de complementar los estudios realizados sobre las células U87 MG y los estudios por citometría de flujo y  $^1\text{H}$ -RMN, se plantea un experimento de microscopía confocal utilizando las tinciones de DAPI y PKH26. La tinción PKH26 es un marcador inespecífico de membrana celular, mientras que el DAPI es un agente intercalante del ADN y por ende marca el núcleo celular. En la Figura 19 se muestra el resultado del ensayo de microscopía confocal.

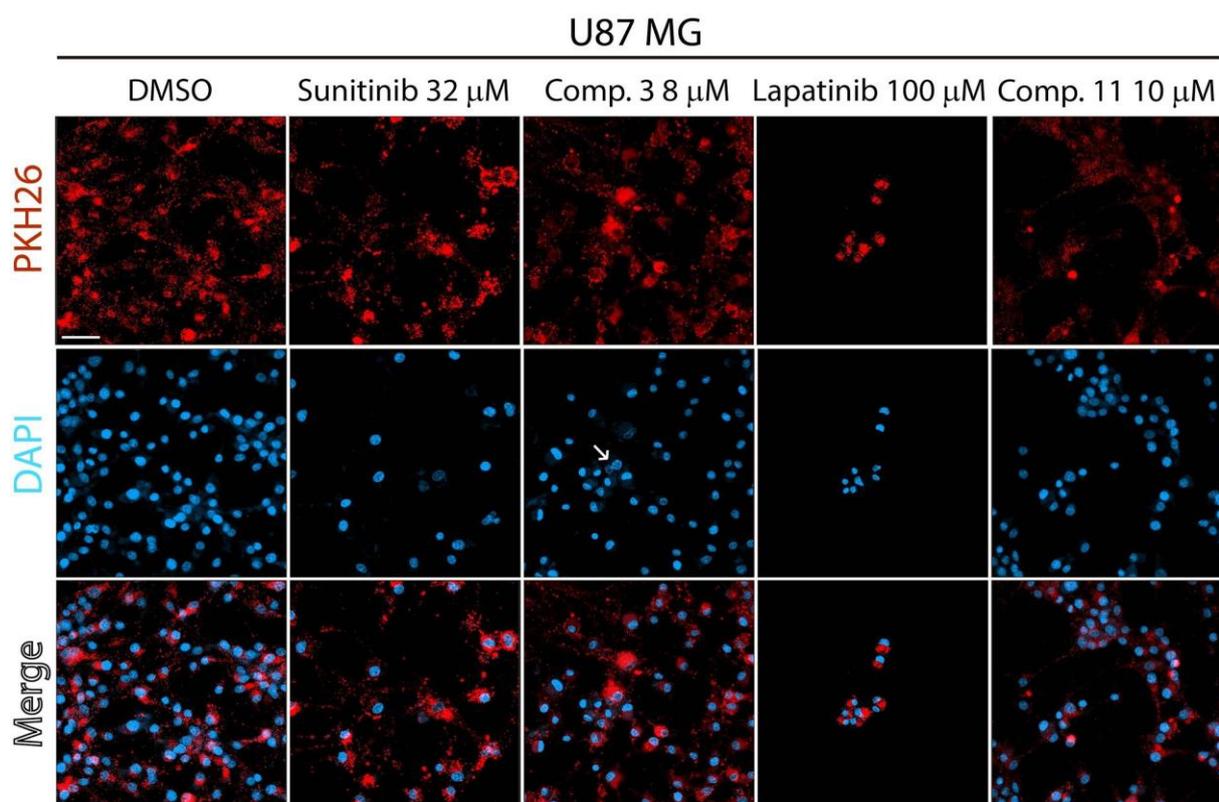


Figura 19. Imágenes obtenidas por microscopía confocal del efecto de los diferentes tratamientos evaluados sobre la línea celular U87 MG. En la primera fila se muestra la tinción PKH26, tinción que marca membrana celular. En la segunda fila de la figura se muestra la tinción DAPI, marcando núcleo. Finalmente, en la tercera fila de la figura se muestra la superposición de ambas tinciones. Con una flecha blanca se indica un núcleo que presenta su cromatina condensada. La barra calibradora se corresponde con 25  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 19 se puede observar ciertas características interesantes de las imágenes de microscopía confocal obtenidas para cada tratamiento. En general, al comparar, con el control, el canal merge de cada condición con un diferente tratamiento se puede evidenciar que todas las condiciones llevan a la muerte celular, debido a la menor cantidad de células observadas en las imágenes correspondientes comparadas con la imagen control.

De forma más específica, por un lado, si se observan las imágenes obtenidas para las células tratadas tanto con el derivado **3** como con sunitinib, a sus respectivas  $IC_{50}$ , se puede observar en el canal DAPI de la *Figura 19* la presencia de ciertos núcleos celulares con la cromatina condensada, proceso característico de la muerte celular por un mecanismo apoptótico <sup>(1-3)</sup>. Los núcleos que presentan su cromatina condensada se observan como círculos con un cierto puntilleo azul sobre un fondo más claro (*Figura 19*, flecha blanca).

Por otro lado, si se observan las imágenes obtenidas para las células tratadas tanto con lapatinib a 100  $\mu$ M y, en particular, aquellas obtenidas para las células tratadas con el derivado **11** a su  $IC_{50}$  se puede observar en el canal PKH26 cómo las células tratadas pierden integridad de membrana comparadas con la situación control, denotado por células con colorante rojo más difuso y de menor intensidad a nivel de su membrana. Cabe recordar que la pérdida de integridad de membrana es característica de la necrosis y de un proceso avanzado de apoptosis <sup>(1-4, 6, 8, 9)</sup>. Para los ensayos de microscopía confocal se evalúa lapatinib a 100  $\mu$ M, a diferencia de lo realizado en el resto de los experimentos (citometría de flujo y  $^1H$ -RMN). Sin embargo, debido a que dicho compuesto no presenta dosis-respuesta en el rango 6.25-100  $\mu$ M (*Figura 6*), en principio, es indiferente la dosis a la cual se decide evaluarlo siempre y cuando la misma se encuentre comprendida en dicho rango.

Al comparar los resultados obtenidos acerca del tipo de mecanismo de muerte celular que inducen los compuestos evaluados en esta tesina, se puede observar que hay cierta concordancia entre las técnicas utilizadas.

Por un lado, tanto para el derivado **3** como para el propio sunitinib se ha visto por citometría de flujo que son capaces de inducir apoptosis en las células U87 MG tratadas con la  $IC_{50}$  de estos compuestos y para el caso del derivado **3** se obtienen resultados estadísticamente válidos.

---

(1) Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Givan, A. L. (1992).

El hecho que tanto el derivado **3** como el propio sunitinib sean capaces de inducir un proceso apoptótico en células U87 MG, va de la mano con el aumento en el cociente entre las señales de los protones de los metilenos móviles respecto de los protones de los metilos móviles observado por  $^1\text{H-RMN}$  para las muestras tratadas con el derivado **3** o con sunitinib, siendo dicho cambio en el caso de la muestra tratada con sunitinib estadísticamente confirmado <sup>(4, 10-13, 15, 17-20, 24)</sup>. Si bien, en el caso del análisis del comportamiento del cociente GPC/Cho por  $^1\text{H-RMN}$  no se obtienen los resultados esperados de acuerdo a lo establecido en la bibliografía para células apoptóticas, es evidente que el comportamiento de los metabolitos relacionados con la colina son dependientes del estímulo apoptótico, de la línea celular y de acción del compuesto sobre esta vía, además de no encontrarse asociados a un tipo de mecanismo de muerte celular en particular <sup>(4, 83, 84)</sup>.

Sumado a lo anterior, mediante microscopía confocal, se logra obtener imágenes para las células U87 MG tratadas con el derivado **3** o con sunitinib donde se observa la presencia de núcleos con cromatina condensada, una característica de la apoptosis <sup>(1-3)</sup>. A su vez, existen descripciones en la literatura acerca de la inducción de apoptosis en células, en particular en U87 MG, por el tratamiento con sunitinib <sup>(61, 73, 74)</sup>. Este hecho refuerza los resultados experimentales obtenidos en la presente tesina, ya que se obtiene el mismo resultado ya previamente descripto.

Por lo tanto, mediante estudios del tipo de mecanismo de muerte celular realizados por las técnicas citometría de flujo,  $^1\text{H-RMN}$  y microscopía confocal, se obtiene una primera aproximación al mecanismo de muerte desencadenado tanto por el derivado **3** como por sunitinib, cuando células U87 son expuestas a una concentración igual a sus  $\text{IC}_{50}$  y durante 24 horas. Las células tienden a morir mayoritariamente por apoptosis.

---

(1) Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (11) Blankenberg, F. G. *et al.* (1996). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (13) Musacchio, T. *et al.* (2009). (15) Hakumäki, J. M. *et al.* (2003). (17) Milkevitch, M. *et al.* (2005). (18) Schmitz, J. E. *et al.* (2005). (19) Al-Saffar, N. M. S. *et al.* (2002). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (24) Blankenberg, F. G. *et al.* (1997). (61) Giannopoulou, E. *et al.* (2010). (73) Joshi, A. D. *et al.* (2012). (74) Fernandez-Fuente, G. *et al.* (2014). (83) Cui, Z. *et al.* (2002). (84) Ridgway, N. D. (2013).

Por otro lado, algo similar sucede para los resultados obtenidos para la serie de lapatinib. Mediante los experimentos de citometría de flujo realizados para células U87 MG tratadas con el lapatinib a 10  $\mu\text{M}$  y con el derivado **11** a su  $\text{IC}_{50}$  y durante 24 horas de exposición, se puede observar que las células tienden a morir mayoritariamente por un proceso necrótico. Mediante la técnica de  $^1\text{H}$ -RMN, al analizar las muestras tratadas con el derivado **11** o con lapatinib en las mismas condiciones que en citometría de flujo, no se obtienen cambios en el cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , respecto del control, que coinciden con descripciones de células muriendo por un proceso necrótico: en la muestra tratada con el derivado **11** se observa un leve aumento de dicho cociente, mientras que en la muestra tratada con lapatinib no se observan cambios <sup>(4, 10, 12, 20)</sup>. En cuanto al comportamiento del cociente GPC/Cho, de acuerdo a lo establecido en la bibliografía, se espera no observar cambios en el mismo en una muestra con células necróticas respecto de una condición control <sup>(4)</sup>. Sin embargo, el aumento en el cociente GPC/Cho observado para la muestra tratada con el derivado **11** o con lapatinib puede explicarse a través del aumento de GPC asociado a la pérdida de integridad de membrana y al desequilibrio osmótico, características del proceso necrótico <sup>(1-4, 6, 8, 9, 84)</sup>.

En el caso particular de la muestra tratada con lapatinib, donde se observa un leve descenso en el cociente GPC/Cho, es necesario tener en cuenta que existen descripciones indicando que cuando células que sobreexpresan EGFR son tratadas con lapatinib, sufren un proceso de autofagia <sup>(70)</sup>. La autofagia afecta el metabolismo de la colina: se requiere la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina para la formación y mantención del autofagosoma <sup>(87)</sup>. Por lo tanto, los cambios en el cociente GPC/Cho en la muestra tratada con lapatinib pueden estarse viendo afectados además por un proceso de autofagia que las células se encuentren sufriendo. La autofagia también repercute sobre el comportamiento del cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , ya que dicho proceso incide sobre el metabolismo de los cuerpos lipídicos <sup>(81, 82)</sup>. La posible inducción de autofagia por el tratamiento con lapatinib de células U87 MG también puede ser una de las razones por las cuales se obtiene diferentes comportamientos en el cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  para dos muestras que de acuerdo a la citometría de flujo inducen necrosis.

---

(1) Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Givan, A. L. (1992). (10) Shih, C. *et al.* (2005). (12) Bezabeh, T. *et al.* (2001). (20) Mikhailenko, V. M. *et al.* (2005). (70) Chen, Y. J. *et al.* (2014). (81) Olzmann, J. A. *et al.* (2018). (82) Kaini, R. R. *et al.* (2012). (84) Ridgway, N. D. (2013). (87) Andrejeva, G. *et al.* (2019).

Finalmente, el perfil necrótico adoptado por la U87 MG frente al tratamiento con el derivado **11** o con lapatinib, es concordante con lo observado mediante microscopía confocal, donde se puede evidenciar cierta pérdida de definición de la membrana celular, al volverse la misma más difusa y menos intensa comparada con la condición control, quizás por la pérdida de tinción PKH26 producto de la pérdida de integridad de membrana, hecho que se encuentra asociado a procesos necróticos <sup>(1-4, 6, 8, 9)</sup>.

En contra de todo lo anterior, existen descripciones en la bibliografía, indicando que ante el tratamiento con lapatinib, las células U87 MG mueren mayoritariamente por un proceso apoptótico <sup>(61)</sup>. Sin embargo, tal y como se argumenta con anterioridad en esta sección, diferencias en la metodología utilizada para evaluar el efecto del tratamiento con lapatinib de células U87 MG pueden ser las que den cuenta de dicha discrepancia.

Por lo tanto, mediante estudios del tipo de mecanismo de muerte celular realizados por las técnicas citometría de flujo, <sup>1</sup>H-RMN y microscopía confocal, se obtiene una primera aproximación al mecanismo de muerte desencadenado tanto por el derivado **11** como por lapatinib, cuando células U87 son expuestas a una concentración igual a sus IC<sub>50</sub> y durante 24 horas. Las células tienden a morir mayoritariamente por necrosis. Sin embargo, para el caso del lapatinib, no se puede descartar que también sea capaz de inducir autofagia.

Debido a que tanto para todas las muestras evaluadas en la presenta tesina se obtienen cambios similares en el cociente GPC/Cho, a pesar de que las células se encuentran muriendo por tipo de mecanismos de muerte celular distintos, según lo detectado por citometría de flujo, en principio el comportamiento de tal cociente no está ligado a un cierto tipo de muerte celular y por lo tanto, mediante su análisis no se puede predecir cómo está muriendo la población celular U87 MG ante un determinado tratamiento.

---

(1) Green, D. R. *et al.* (2015). (2) Krysko, D. V. *et al.* (2008). (3) Alberts, B. *et al.* (2008). (4) Rainaldi, G. *et al.* (2008). (6) Vermes, I. *et al.* (1995). (8) Baskić, D. *et al.* (2006). (9) Givan, A. L. (1992). (61) Giannopoulou, E. *et al.* (2010).

## 9. Conclusiones y perspectivas

En la presente tesina de grado se pudo evaluar la citotoxicidad de dos series de compuestos frente a la línea celular U87 MG derivada de GBM humano: una serie derivada del fármaco sunitinib y otra derivada del fármaco lapatinib, ambos inhibidores de tirosina quinasas de uso extensivo en terapias antitumorales. Los derivados desarrollados por el Dr. Marcos Couto a partir de estos fármacos anticancerígenos tienen como objetivo poder combinar dos terapias usadas para el tratamiento de un tipo particular de tumor cerebral, el GBM. Así, se aprovecha la presencia en sus estructuras del farmacóforo carborano, una estructura de alto contenido en boro, que permite potencialmente acoplar la BNCT junto con la terapia dirigida, dada por la sub-estructura inhibidora de tirosina quinasas propias de sunitinib y lapatinib.

Entre ambas series, surgieron cuatro compuestos considerados citotóxicos frente a la línea U87 MG, de acuerdo al porcentaje de supervivencia celular cuando son evaluados a 100  $\mu\text{M}$  a 24 horas: tres compuestos pertenecientes a la serie de sunitinib, denominados derivado **2**, **3** y **4**, y un compuesto perteneciente a la serie de lapatinib, el derivado **11**. Se determinan las  $\text{IC}_{50}$  de cada uno de estos derivados siendo las mismas:

- derivado **2** de la serie de sunitinib: 7  $\mu\text{M}$
- derivado **3** de la serie de sunitinib: 8  $\mu\text{M}$
- derivado **4** de la serie de sunitinib: 8  $\mu\text{M}$
- derivado **11** de la serie de lapatinib: 10  $\mu\text{M}$

También se determinan las  $\text{IC}_{50}$  de los fármacos padres, siendo las mismas 32  $\mu\text{M}$  para el caso de sunitinib, mientras que lapatinib resultó ser no citotóxico en el rango de concentraciones entre 6.25  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  en la línea celular U87 MG cuando es expuesto durante 24 horas, no habiéndose alcanzado la dosis equivalente a la  $\text{IC}_{50}$ .

El derivado **3** de la serie de sunitinib y el derivado **11** de la serie de lapatinib fueron seleccionados para comenzar a estudiar su mecanismo de muerte celular, junto con los fármacos de los que derivan.

Para ello, en primera instancia, se realizan estudios de citometría de flujo, para determinar el tipo de mecanismo de muerte celular por el cual mueren células U87 MG cuando son tratadas con estos compuestos a la concentración equivalentes a sus  $\text{IC}_{50}$ . En el caso particular de lapatinib, es evaluado a 10  $\mu\text{M}$ , la  $\text{IC}_{50}$  de su derivado. Los resultados de los

experimentos de citometría de flujo indican que tanto el derivado **3** de la serie de sunitinib como el propio sunitinib parecen inducir mayoritariamente un proceso apoptótico en células U87 MG, mientras que el derivado **11** de la serie de lapatinib así como el propio lapatinib, parecen inducir mayoritariamente un proceso necrótico en dicha línea celular. Para conseguir una robustez estadística adecuada se hace necesario aumentar el número de réplicas para confirmar estas tendencias observadas de forma inicial.

La otra técnica mediante la que se estudió el tipo de mecanismo de muerte celular provocado por el tratamiento con cierto derivado fue la  $^1\text{H}$ -RMN. De forma general, cuando se utiliza la técnica de  $^1\text{H}$ -RMN se sigue el comportamiento de dos grupos de señales: aquellas asociadas a protones de metilos y metilenos de lípidos móviles, y aquellas asociadas a protones de diferentes formas de la colina.

Como resultado de los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN realizados sobre suspensiones celulares de U87 MG tratadas con los diferentes compuestos se obtiene que:

- tanto el derivado **3** como el propio sunitinib provocan un aumento en el cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  respecto al control. Esto se asocia con la puesta en marcha de un proceso apoptótico en la suspensión celular evaluada y coincide con el resultado obtenido por citometría. Únicamente para el caso del sunitinib este cociente, respecto al control, resultó ser estadísticamente diferente.
- el derivado **11** es capaz de provocar un leve aumento en el cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  respecto al control, mientras que lapatinib no provoca mayores cambios en el cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  respecto al control, resultando estadísticamente no-diferentes. Teniendo en cuenta las descripciones de la literatura, los resultados obtenidos mediante  $^1\text{H}$ -RMN coinciden con los obtenidos por citometría de flujo, muerte celular por necrosis. De forma adicional, es posible que lapatinib sea capaz de inducir autofagia. Este hecho también repercute en los resultados obtenidos, ya que la autofagia interviene en el metabolismo de los cuerpos lipídicos, los cuales constituyen una de las fuentes celulares de los lípidos móviles. Por lo tanto, es posible que en el caso del lapatinib, un proceso inducido de autofagia se encuentre influyendo sobre el comportamiento del cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ .
- respecto al comportamiento de las señales relacionadas con diferentes formas de colina, se observa para las muestras tratadas con el derivado **3**, el derivado **11**, con sunitinib o con lapatinib un aumento en el cociente  $\text{GPC}/\text{Cho}$ , no resultando ser estadísticamente diferentes respecto al control.

Finalmente, del ensayo de microscopía confocal los resultados obtenidos coinciden con las tendencias observadas mediante las otras dos técnicas previamente mencionadas. Cuando se tratan las células con el derivado **3** o con sunitinib se observa condensación de la cromatina a nivel nuclear, mientras que en el caso de aquellas tratadas con el derivado **11** o con lapatinib se observa pérdida de integridad de membrana.

Por lo tanto, como conclusión general de este trabajo final de carrera se tiene que mediante la utilización de las técnicas de citometría de flujo, <sup>1</sup>H-RMN y microscopía confocal se pudo estudiar el tipo de mecanismo de muerte celular inducido por compuestos de interés: el derivado **3** de la serie de sunitinib y el derivado **11** de la serie de lapatinib, junto con sus respectivos fármacos padres.

A pesar de la concordancia obtenida entre los resultados de las diferentes técnicas utilizadas para el estudio del tipo de mecanismo de muerte celular en la presente tesina, es evidente que la <sup>1</sup>H-RMN es una técnica que requiere un análisis mucho más profundo, detallado y personalizado de los resultados, comparado por ejemplo con citometría de flujo, ya que no existen software de análisis. Por ello, si bien representa una técnica complementaria, o en ciertos casos sustituta, a la citometría de flujo, el análisis de resultados de citometría de flujo es más directo y sencillo que aquellos obtenidos mediante <sup>1</sup>H-RMN, por la accesibilidad actual a software amigables, y por lo tanto como primera aproximación a estudios de mecanismos de muerte celular la citometría de flujo representa la técnica a elegir. De todas formas, es innegable la cantidad de información proporcionada por la <sup>1</sup>H-RMN relacionada a los estudios de mecanismo de muerte celular. Se puede estudiar el comportamiento de múltiples metabolitos y componentes de la membrana celular utilizando una única técnica, lo que lo hace una técnica muy poderosa a la vez de compleja a la hora de asociar tales comportamientos a un tipo de mecanismo de muerte celular dado, sin tener indicios de cuál de ellos está actuando.

Las principales perspectivas planteadas para este trabajo es continuar y profundizar con los estudios de citometría de flujo y <sup>1</sup>H-RMN aquí mostrados de forma tal de aumentar el número de réplicas que permitan confirmar o refutar las tendencias observadas. A su vez, es necesario plantearse como perspectiva realizar estudios específicos acerca de si los compuestos aquí evaluados, en particular lapatinib y el derivado **11**, son capaces de inducir autofagia en células U87 MG en las mismas condiciones utilizadas para los experimentos de citometría de flujo y de <sup>1</sup>H-RMN.

Experimentos tales como la tinción de la membrana de autofagosomas con naranja de acridina y su cuantificación por citometría de flujo, así como experimentos de toxicidad celular en presencia de inhibidores de la autofagia, como la 3-metiladenina o la cloroquina, son ejemplos de los experimentos a realizarse en el futuro para estudiar la capacidad de los compuestos aquí evaluados de inducir autofagia en células de U87 MG.