

Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Búsqueda de compuestos citotóxicos selectivos en células gliales tumorales

Aproximaciones *in vitro* e *in vivo*

Tesina de Grado

Ignacio Mastandrea

Orientadores:

Mauricio Cabrera y Pablo Díaz-Amarilla



Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR.
Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Marzo de 2015

Agradecimientos

A Mauricio y Pablo, por su orientación y disposición, por todo lo que me enseñaron, por su genuino interés en mi formación, por integrarme a sus proyectos y permitirme participar activamente, por todas esas discusiones y por lo que viene.

A Silvia, por permitirme formar parte del NBCM, por su inmensa ayuda, por su interés y participación en este trabajo.

A Mercedes y a Hugo, por abrirme las puertas de Química Orgánica, por sus enseñanzas y calidez humana.

A mis compañeros de Química Orgánica y NBCM, por todos esos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por haber formado parte de esto y por hacerme sentir cómodo.

A Juan Pablo, por tan amablemente corregir este trabajo, aun cuando los tiempos son desfavorables.

A mis amigos de la facultad y de siempre, por todos estos años, por formar parte de mi vida dentro y fuera de la facultad, por mantenerme con los pies en la tierra.

A mi familia, mis padres y mi hermana, por su apoyo incondicional, por su confianza y por acompañarme hoy y siempre.

A todos, gracias por hacer esto posible.



Resumen	5
Abreviaturas	6
INTRODUCCIÓN	7
<u>CÁNCER</u>	8
GENERALIDADES DEL CANCER	8
<u>GLIOMAS</u>	10
GENERALIDADES	10
EPIDEMIOLOGIA	12
TERAPIA Y DIAGNÓSTICO	15
<u>MODELOS ANIMALES DE CARCINOGENESIS</u>	17
GENERALIDADES	17
MODELOS ANIMALES DE GLIOMA	19
INDUCCIÓN QUÍMICA DE GLIOMAS	20
ANTECEDENTES	24
ANTECEDENTES PROPIOS	25
OBJETIVO	27
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
GENERALIDADES	30
APROXIMACIONES <i>IN VITRO</i>	30
<i>Obtención de cultivo primario de astrocitos de corteza</i>	30
<i>Criopreservación/Revitalización</i>	31
<i>Mantenimiento de líneas celulares y cultivos primarios</i>	31
<i>Recuento y evaluación de viabilidad celular</i>	32
<i>Análisis de citotoxicidad</i>	32
<i>Uso de quimioteca propia</i>	33
<i>Análisis estadístico</i>	33
APROXIMACIONES <i>IN VIVO</i>	34
<i>Inyecciones en cisterna magna</i>	34
<i>Perfusión y disección de tejido</i>	34
<i>Obtención de cortes sagitales y coronales de cerebro</i>	35

<i>Análisis histológico por microscopía láser confocal y de Nomarski</i>	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
<u>APROXIMACIONES IN VITRO</u>	38
SELECCIÓN DE COMPUESTOS DE QUIMIOTECA PROPIA	38
CITOTOXICIDAD EVALUADA A DOSIS FIJA	41
CITOTOXICIDAD EVALUADA A DOSIS - RESPUESTA	44
DETERMINACIÓN DE SELECTIVIDAD	47
<u>APROXIMACIONES IN VIVO</u>	50
INCURSIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE INDUCCIÓN DE GLIOMA	50
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	58



Resumen

Los gliomas son uno de los principales tipos de tumor del sistema nervioso central (SNC) presentando una alta incidencia de muerte dependiendo de las características del tumor y del estadio de su diagnóstico. La utilización de agentes quimioterápicos está indicada para el tratamiento de gliomas de grado II o superior. Debido a la presencia de la barrera hematoencefálica que limita el ingreso de los fármacos dentro del SNC, y a la poca selectividad, existen grandes limitaciones en la propuesta farmacéutica para el tratamiento de ésta enfermedad, siendo todavía un campo activo de estudio. En nuestro grupo se cuenta con experiencia en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales, por lo que en este trabajo se propone hacer una selección de moléculas con actividad previa ya descrita y realizar un método de tamizaje efectivo para seleccionar los compuestos con mejor actividad en un modelo *in vitro* de glioma, con el fin de encontrar moléculas altamente citotóxicas que sean selectivas en líneas tumorales gliales. De modo de obtener un modelo *in vivo* para ensayar los compuestos de actividad prometedora y diseñar nuevas estrategias de terapia y diagnóstico se propone incursionar en un nuevo modelo animal de carcinogénesis química.

En este trabajo se lograron identificar algunos flavonoides citotóxicos selectivos para una línea tumoral de astrocitoma de rata inducido químicamente y realizar una primera aproximación a la propuesta de un modelo animal de tumorigénesis glial con potencial uso en la investigación diagnóstica y biomédica.

ABREVIATURAS

% sup - Porcentaje de supervivencia

ADN - Ácido desoxiribonucleico

CBTRUS - *Central Brain Tumor Registry of the United States*

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol

DMEM - Medio Dulbecco's Modified Eagle

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilendiaminotetracético

ENU - *N*-etil-*N*-nitrosourea

FDA - *Food and Drug Administration*

GBM - Glioblastoma multiforme

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial.

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxyetil)-1-piperazinetanosulfónico

IC₅₀ - Concentración inhibitoria del 50%

IS - Índice de selectividad

LCR - Líquido cefaloraquídeo

MNU - *N*-metil-*N*-nitrosourea

NCI - *National Cancer Institute*

OMS - Organización Mundial de la Salud

PAF - Paraformaldehído

PBS - Tampón fosfato salino

SFB - Suero fetal bovino

UV - Luz ultravioleta

wt - *wild type*





INTRODUCCIÓN

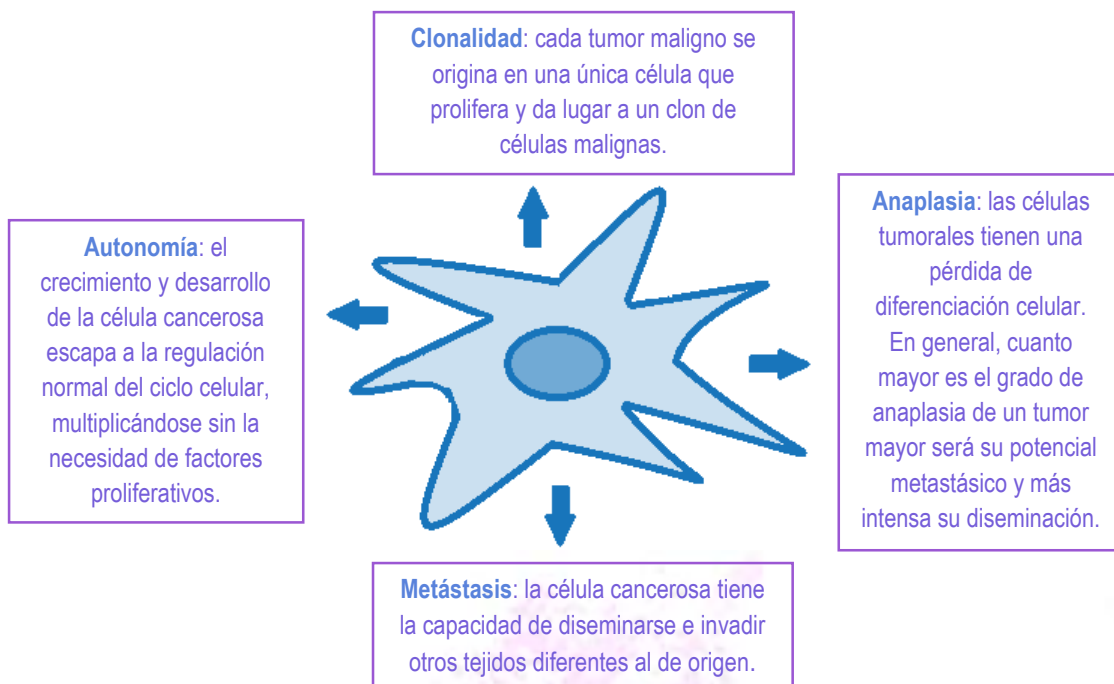


CÁNCER

GENERALIDADES DEL CANCER

En la actualidad se abarca dentro de la definición de cáncer a un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas de etiología multifactorial cuyo factor común es un desequilibrio en la relación proliferación/muerte celular. La adquisición de múltiples mutaciones genéticas provoca que las células cancerosas evadan los mecanismos de control propios y que comiencen a dividirse descontroladamente, adquiriendo la capacidad de invasión (local o a veces a distancia) y destrucción tisular, comprometiendo la salud del organismo¹.

Las características principales de las células cancerosas se resumen en el siguiente esquema²:



La proliferación celular descontrolada de las células mutantes puede dar origen a una masa celular conocida como tumor o *neoplasma*¹. Son varios los factores alterados en la biología de la célula cancerosa que permiten la formación y mantenimiento de la masa tumoral. Se puede ver que se adquiere la habilidad de evadir la respuesta inmune, inducir la angiogénesis, ser capaces de volverse resistentes a

¹ Kastan M. *Biología molecular del cáncer: el ciclo celular*, en *Cáncer: principios y práctica de oncología*. Editor DeVita, V. 5º ed, Arán Ediciones S.A., 2000.

² Cajaraville G.; Carrera MJ.; Massó J., Tamés MJ. *Oncología. En Farmacia Hospitalaria*. Editorial Médica Internacional S.A., 3ª Edición. Madrid. 2002. pág. 1171-1175.

la apoptosis y a las señales que reprimen su crecimiento, así como mantener un estado proliferativo constante independientemente muchas veces del ambiente en que se encuentra (lograr independencia de factores de crecimiento, modificar el ambiente que lo rodea promoviendo una inflamación asociada al tumor) y de tener un balance energético favorable, por lo que las vías metabólicas de las células pueden ser desregularizadas (favoreciendo por ejemplo la ruta glicolítica)³.

Una vez formado el tumor si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, se dice entonces que el tumor es benigno. Esto significa que las células anormales aún no han adquirido la capacidad de realizar metástasis, es decir, no se han diseminado hacia otros tejidos, por lo que mediante extirpación quirúrgica del tumor puede lograrse la curación⁴. Ahora, cuando las células neoplásicas adquieren la capacidad de invadir el tejido circundante, se considera al tumor como maligno y propiamente canceroso, debido a la capacidad de formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo.⁵

El criterio para las clasificaciones de los tumores deriva de las células o tejidos donde los mismos se originan. Aquellos tumores que derivan de células del tejido conectivo (hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos y músculos) son conocidos como sarcomas, mientras que los carcinomas se caracterizan por proceder de tejidos epiteliales como la piel, epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales y los tejidos glandulares de mama y próstata. Un tercer tipo lo constituyen las leucemias y linfomas, que comprenden diversas formas de cáncer de los sistemas hematopoyético e inmunitario. Además de esa clasificación existen subdivisiones dentro de cada categoría según el tipo celular particular que le dio origen, la localización del tumor en el cuerpo y la estructura del mismo. Cabe destacar que la mayor parte (aproximadamente el 90%) de los cánceres humanos son carcinomas, relacionada la aparición de estas clases de neoplasias al alto ritmo proliferativo de los tejidos epiteliales así como a la exposición de los mismos a diversas formas de lesión física y química que pueden inducir el desarrollo del cáncer.^{2,3}

Una característica importante de los tumores, vital para determinar el peligro que el mismo representa para el paciente y para visualizar un pronóstico de la enfermedad, es su grado histológico. Se define al grado histológico como la descripción del tumor en base a lo anormal que se ven las células y el tejido tumoral bajo el microscopio tras obtenida una biopsia. Éste sirve como un indicador de que tan rápido un tumor puede llegar a crecer y diseminarse. A un tumor se le denomina “bien diferenciado” y se le asigna un grado bajo si las células del mismo y la organización del tejido tienen características bastante parecidas al tejido

³ Hanahan D.; Weinberg RA. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011, 144(5): 646 –674

⁴ Rosenberg S. *Principios de tratamiento Del cáncer: cirugía oncológica, en Cáncer; principios y práctica de oncología*. Editor DeVita, V. 5º ed, Arán Ediciones S.A., 2000.

⁵ Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson JD. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega S.A., 5ª Edición. Barcelona. 2010.

de origen de la neoplasia. Los tumores de grado bajo tienden a expandirse en una tasa mucho menor que en el caso de un tumor “indiferenciado” o “pobrementemente diferenciado”, a los cuales se les asigna un grado alto. Los tumores de alto grado tienen células de apariencia anormal, pobrementemente diferenciadas (anaplásicas) y carecen de la estructura normal del tejido. Cabe destacar que la gradación del tumor no es lo mismo que la estadificación del mismo, el estadio del cáncer no hace referencia a características histológicas sino al tamaño y alcance del tumor primario⁶.

Si bien los criterios para la gradación del tumor pueden variar según el tipo de cáncer, sigue siendo un factor importante a la hora de determinar una estrategia terapéutica para el paciente. Cabe destacar que a pesar de que el cáncer ha sido estudiado por años desde diferentes abordajes tanto biológicos como bioquímicos, aún no se ha descubierto un tratamiento eficaz y seguro para el mismo. Los tratamientos actuales incluyen la remoción quirúrgica de tumores⁴, la radioterapia⁷ y la quimioterapia⁸. La remoción quirúrgica se dificulta cuando la localización del tumor es delicada, cuando los mismos son difusos o si aparecen múltiples metástasis. Las radiaciones ionizantes y agentes quimioterápicos pueden ser dirigidos a un tejido u órgano, pero el hecho de que haya pocas diferencias entre una célula tumoral y una normal hacen que la erradicación selectiva de las células tumorales sea una tarea muy complicada.

GLIOMAS

GENERALIDADES

Generalmente los distintos tipos de tumores son clasificados según el tipo celular que le da origen, basándose en características morfológicas e inmunohistoquímicas. Aunque es comúnmente usado, existe un cierto desafío a la hora de aplicarlo en los tumores del sistema nervioso central, ya que el actual origen de las células que conforman la neoplasia en cuestión es desconocido para la mayoría de los tumores cerebrales. Dentro de los tumores con mayor relevancia del SNC se encuentran los gliomas, denominados así por su origen glial, aunque existe de hecho evidencia experimental proveniente de modelos animales que indica que es altamente probable que los gliomas se originen a partir de los precursores gliales más que de astrocitos u oligodendrocitos completamente diferenciados⁹. Aún así, la clasificación histológica acordada por la OMS es usada universalmente en el campo de la neuro-oncología ya que permite una

⁶ National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Cancer topics: Detection and Diagnosis – Tumor Grades.

<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-grade>. Fecha de acceso: 11/2/2015

⁷ Hellman S. *Principios para el manejo del cáncer: radioterapia*, en *Cáncer; principios y práctica de oncología*. Editor DeVita V, 5^o ed, Arán Ediciones S.A., 2000.

⁸ Schwarz J.; Yarbo J. *Scientific basis of cancer chemotherapy*, en *The chemotherapy source book*. Editor Perry M, 3^a ed, Lippincott Williams & Williams, 2001.

⁹ Shih AH, Holland EC. *Developmental neurobiology and the origin of brain tumors*. J Neurooncol. 2004, 70(2): 125–135

separación significativa de tumores biológica y clínicamente distintos, cosa que ningún otro criterio de diagnóstico es capaz de hacer¹⁰.

Los astrocitomas, derivados de astrocitos o sus precursores, comprenden más de un 70% de las neoplasias gliales y abarcan tanto a un grupo heterogéneo de tumores difusos e infiltrantes (astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico, glioblastoma y *gliomatosis cerebri*) y un grupo menos común de neoplasmas con un crecimiento más limitado, como ser el astrocitoma pilocítico, el astrocitoma subependimal de células gigantes y el xantastrocitoma pleomórfico. Los del segundo grupo se desarrollan más en niños y adultos jóvenes, teniendo un potencial limitado para la progresión maligna y son generalmente curados por resección quirúrgica. Sin embargo los astrocitomas del otro grupo son difíciles de remover por su naturaleza difusa e infiltrante y tienen gran tendencia a desarrollar malignidad por su inestabilidad genómica, se caracterizan por ser difíciles de tratar. Otro tipos de glioma de menor incidencia son los oligodendrogliomas (derivados de oligodendrocitos), los ependimomas (derivados de células ependimarias que forman el revestimiento de los ventrículos del encéfalo y del conducto ependimario) y los gliomas mixtos (formados por una población heterogénea de células neoplásicas de origen astrocítico y oligodendrogliar). Estos tipos de glioma pueden presentarse bien limitados y exhibiendo características propias del tejido como también pueden ser difusos, infiltrantes y de rasgos anaplásicos, lógicamente siendo estos últimos mucho más agresivos^{10,11}.

En adición a la clasificación morfológica para la tipificación del tumor también involucra la gradación del mismo, abarcando en el caso de los gliomas tumores de grado I (benignos), hasta grado IV (alto grado de malignidad). Para la clasificación en grados se requiere un análisis anatomopatológico para determinar qué tan anormal es el tejido extraído en la biopsia, asignándole un grado mayor a aquellas muestras que exhiban rasgos anaplásicos, gran celularidad, alta tasa mitótica, atipia nuclear, proliferación vascular y necrosis. Los gliomas grado I como el astrocitoma pilocítico tienen una proliferación limitada y pueden tener cura mediante la extirpación quirúrgica. Los gliomas grado II, aun considerados de bajo grado, se caracterizan por mostrar atipia citológica y por la capacidad de invadir el tejido circundante como en el caso de los astrocitomas difusos. Los gliomas son considerados de alto grado, a partir del grado III, son los más temidos por su agresividad, mal pronóstico y su repercusión en las funciones cognitivas¹², se caracterizan por una alta tasa mitótica y por presentar anaplasia. Ya cuando se observa la proliferación microvascular y/o

¹⁰ Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol., 2007, 114(2):97-109.

¹¹ Reifenberger G.; Blümcke I.; Pietsch T.; Paulus W. *Oncology of CNS Tumors: Pathology and Classification of Tumors of the Nervous System*, 2ª Ed.; European Journal of Neurology. 2010.

¹² Porter KR, McCarthy BJ, Freels S, Kim Y, Davis FG. *Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology*. NeuroOncol, 2010, 12(6):520-527.

necrosis, los gliomas se categorizan dentro de grado IV, también conocidos como glioblastomas multiformes (GBM) ¹⁰. Entre el 90-95% de los GBM se originan como GBMs primarios mientras que entre un 5-10% evolucionan a partir de gliomas de bajo grado, principalmente en pacientes jóvenes y se conocen como GBM's secundarios¹³. Los glioblastomas multiformes tienen un muy mal pronóstico para el paciente ya que son tumores extremadamente invasivos que infiltran fácilmente el parénquima cerebral, aunque típicamente no sufren metástasis¹⁴. Gliomas de distinto grado se visualizan en la **figura 1**.

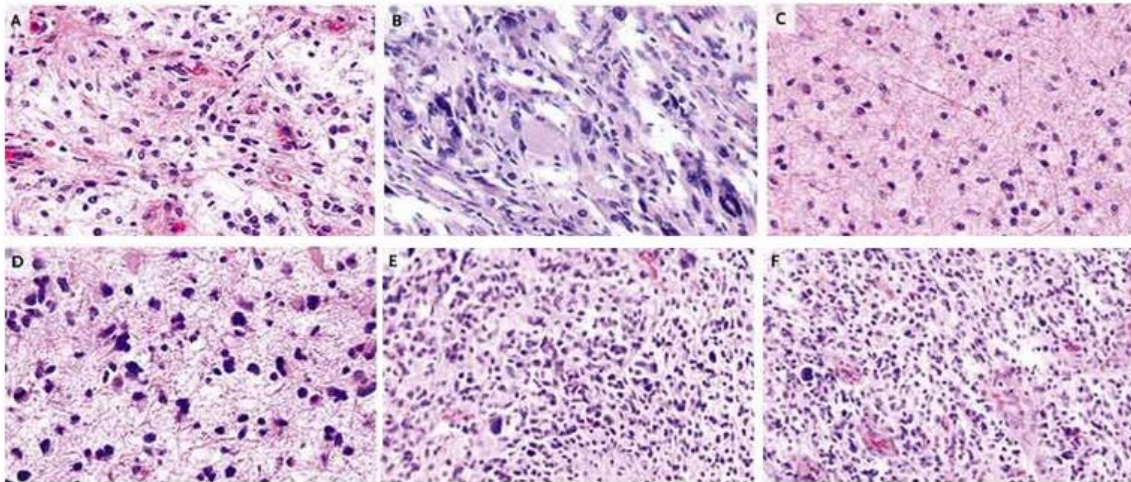


Figura 1. Distintos tipos de glioma de alto y bajo grado visualizados con tinción clásica de hematoxilina-eosina. A corresponde a un astrocitoma pilocítico (grado I), B y C (xantoastrocitoma pleomórfico y astrocitoma difuso) y muestran gliomas de bajo grado con limitada capacidad de invadir tejido cerebral. En D se muestra un astrocitoma anaplásico de grado III. Finalmente en E y F se visualiza tejido correspondiente a un glioblastoma (astrocitoma grado IV). Adaptada de ¹¹

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de cerebro abarca aproximadamente el 1,4% de todos los cánceres y el 2,3% de todas las muertes relacionadas con el cáncer¹⁵. Como se observa en la **figura 2**, el tipo de tumor más frecuentemente reportado (correspondiendo a más de un tercio de los casos) es el meningioma, que es un tumor benigno, seguido por el glioblastoma, el glioma maligno que corresponde a la forma más agresiva de los tumores del

¹³ Ohgaki H, Kleihues P. *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas.* J Neuropathol Exp Neurol., 2005, 64(6):479-89.

¹⁴ Gibbons RJ, Smith S, Antman E, *American College of Cardiology, American Heart Association. American College of Cardiology/American Heart Association clinical practice guidelines: Part I: where do they come from?* Circulation, 2003, 107(23):2979-2986.

¹⁵ El-Zein R., Bondy M., Wrensch M. *Brain Tumors: Epidemiology of Brain Tumors. Contemporary Cancer Research.* 2005, pp 3-18.

SNC. Si agrupamos a todos los gliomas (mayoritariamente tumores malignos, corresponden a un 80% de los tumores malignos del SNC) en una categoría, estos abarcan aproximadamente un 30% de este tipo de tumores¹⁶.

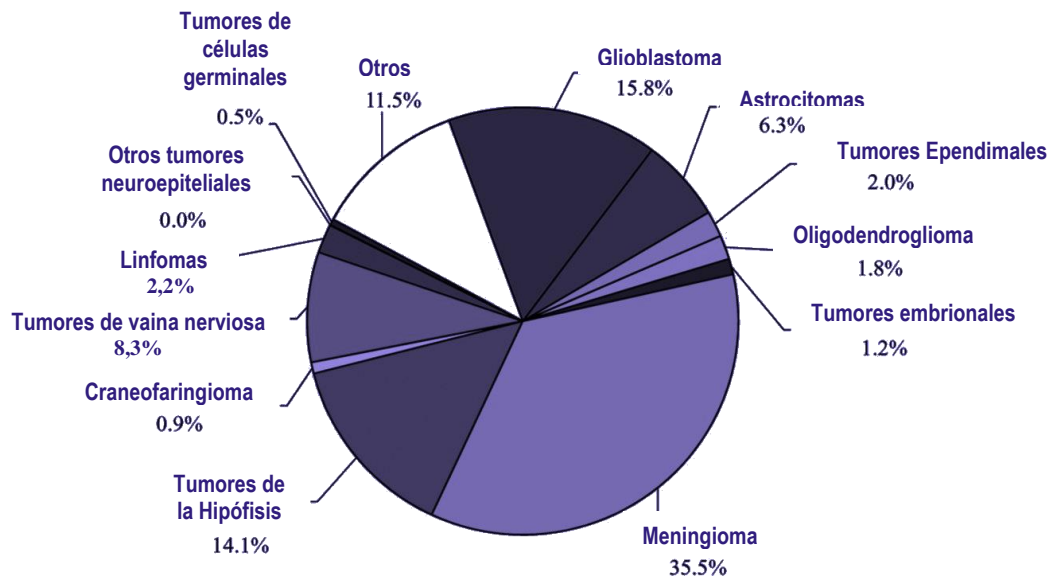


Figura 2. Distribución de los tumores del SNC según su origen¹⁶

Dentro de los gliomas, el GBM es el más frecuente y junto con las demás variedades de astrocitomas de menor grado comprenden más de tres cuartos de las variedades de gliomas reportadas (figura 3)¹⁶.

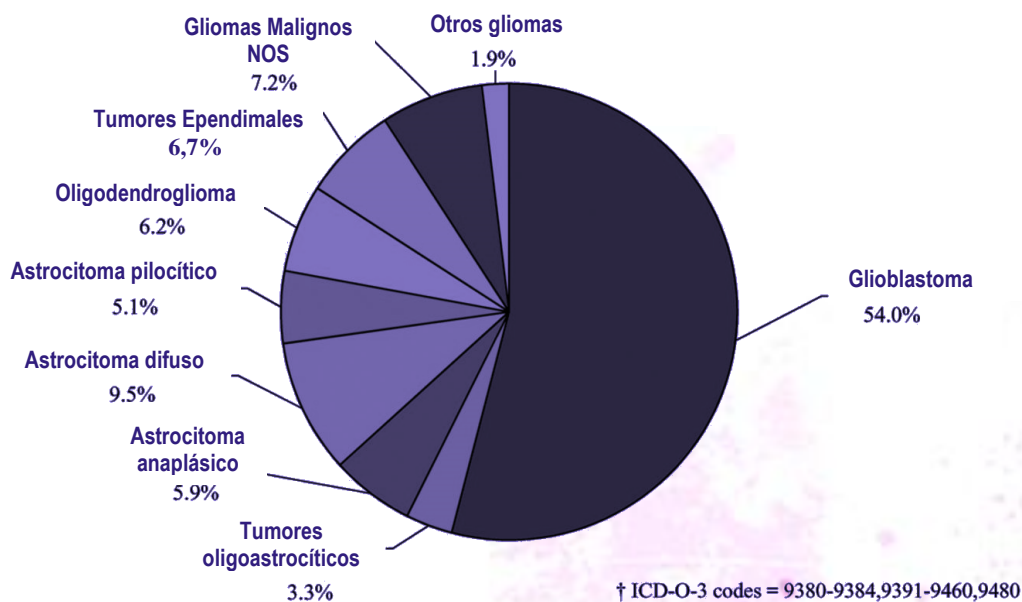


Figura 3. Distribución de los gliomas según su histología específica¹⁶

¹⁶ Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. Neuro-oncol. 2012;14(suppl 5):v1-v49.

Si bien los tumores del SNC no tienen una alta incidencia a nivel mundial, si poseen un alto grado de morbilidad y mortalidad tal como se observa en la **figura 4**¹⁷.

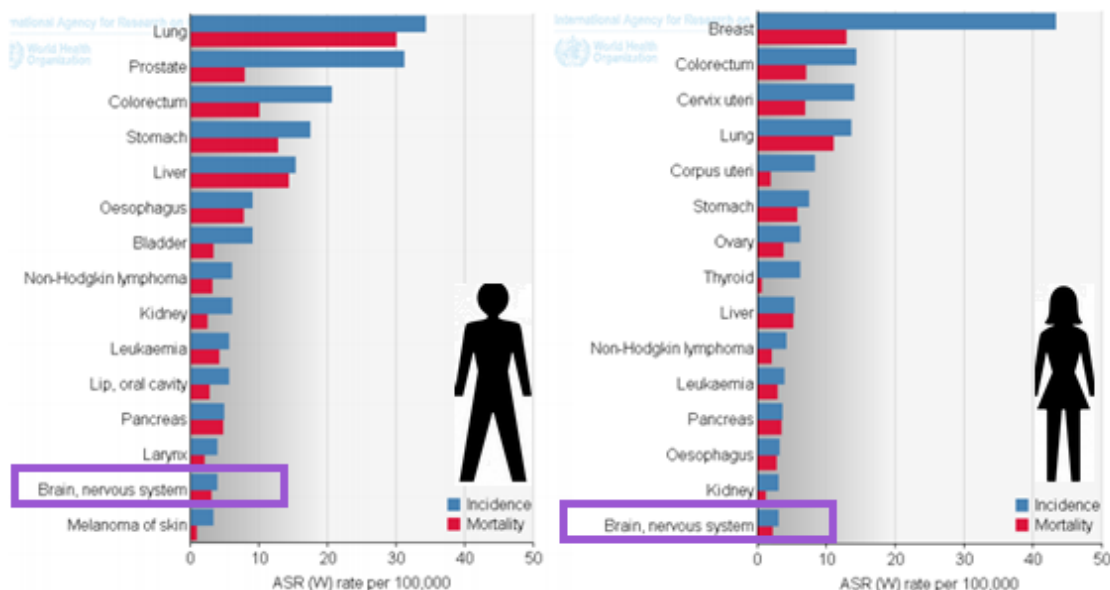


Figura 4. Tasas normalizadas de incidencia y mortalidad de distintas variedades de cáncer¹⁷

La supervivencia de los pacientes diagnosticados con glioma varía considerablemente de acuerdo a su edad, estilo de vida y tipo de tumor que haya desarrollado, así como su localización, ya que esto determina si puede ser removido quirúrgicamente así como las posibles secuelas de la cirugía. En la **tabla 1** se muestra la tasa de supervivencia a 5 años para varios grupos etarios y para distintos gliomas, cabe destacar que algunos datos pueden no ser 100% fiables debido a la rareza y complejidad para clasificar los mismos¹⁶.

Tabla 1. Tasa de supervivencia a 5 años para pacientes de Glioma. Adaptada de ¹⁶

TIPO DE GLIOMA	TASA DE SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS		
	Edad		
	20-44	45-54	55-64
ASTROCITOMA DE BAJO GRADO	65%	43%	21%
ASTROCITOMA ANAPLÁSICO	49%	29%	10%
GLIOBLASTOMA MULTIFORME	17%	6%	4%
OLIGODENDROGLIOMA	85%	79%	64%
OLIGODENDROGLIOMA ANAPLÁSICO	67%	55%	38%
EPENDIMOMAS	91%	86%	85%

¹⁷ World's Health Organization. *World Cancer Report 2012*, IARC Nonserial Publication, 2012.

TERAPIA Y DIAGNÓSTICO

Con respecto a la terapéutica, los tratamientos de preferencia de los gliomas en adultos son la cirugía y la radioterapia. La remoción quirúrgica del tumor de ser posible, siempre es el primer paso independientemente del tipo de glioma en cuestión, siendo por sí sola suficiente para el tratamiento de gliomas de grado I. Si bien las cirugías son generalmente de alto riesgo para el paciente, pudiendo dejar secuelas importantes y comprometer sus capacidades motoras o cognitivas, los recientes avances técnicos en radiología y neurocirugía han permitido disminuir la morbimortalidad asociada a este tipo de intervenciones mediante el uso de resonancia magnética funcional, técnicas de espectroscopia y monitoreo electrofisiológico intraoperatorio. Así mismo, los progresos en la aplicación de radioterapia y, más recientemente la radiocirugía, han permitido disminuir considerablemente el grado de neurotoxicidad a largo plazo. De esta manera, pacientes que hace algunos años eran considerados como inoperables se benefician cada vez más de un tratamiento adaptado.

La utilización de quimioterapia está indicada para el tratamiento de gliomas de grado II o superior, y su uso en pacientes adultos ha sido el objeto de múltiples estudios multicéntricos en los últimos años^{18,19}, debido a las limitaciones que ha demostrado. Las dificultades para obtener resultados terapéuticos mediante la administración de quimioterapias utilizadas en tumores de otros órganos se explican por la presencia de la

barrera hematoencefálica que limita el ingreso de los fármacos dentro del SNC. Por esta razón, los gliomas malignos se

consideraron durante mucho tiempo “quimioresistentes” a los medicamentos antineoplásicos lo que llevó a descartar a la quimioterapia como herramienta terapéutica primaria²⁰. Actualmente el agente quimioterápico utilizado por excelencia es la temozolomida (**figura 5**), agente alquilante que ofrece la ventaja de tener efectos secundarios relativamente leves y de poder ser administrado por vía oral.

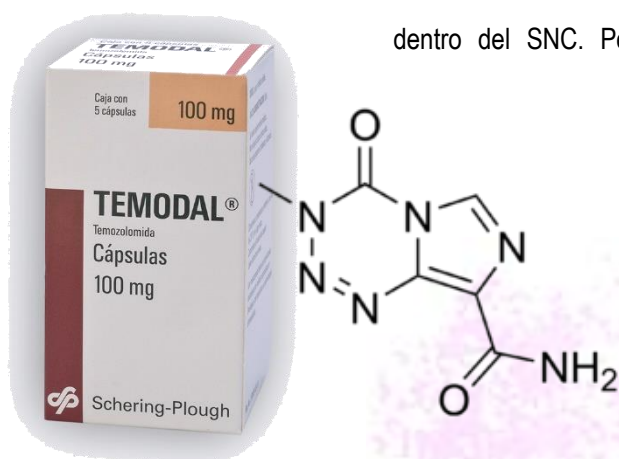


Figura 5. Estructura química y presentación de la forma farmacéutica del laboratorio Schering-Plough de la Temozolomida principal agente quimioterápico para tratamiento de gliomas.

¹⁸ Drappatz J, Schiff D, Kesari S, Norden AD, Wen PY. *Medical management of brain tumor patients*. *Neurol Clin*, 2007, 25:1035-1071.

¹⁹ Kaloshi G, ouaich-Amiel A, Diakite F, Taillibert S, Lejeune J, Laigle-Donadey F, et al. *Temozolomide for lowgrade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome*. *Neurology*, 2007, 68:1831-1836.

²⁰ Reyes-Botero GA. *Gliomas in adults: diagnostic and therapeutical approach*. *Acta Neurol Colomb*, 2008, 25:34-41.

Otros agentes alquilantes del ADN como las nitrosoureas y el anticuerpo bevacizumab han llegado a implementarse en estudios de fase clínica avanzada²¹. En nuestro país, agentes como la temozolomida están disponibles, sin embargo, el Fondo Nacional de Recursos solo habilita fármacos de alto costo para el tratamiento en el caso que se diagnostique un glioblastoma multiforme. Sin embargo, a pesar de contar con agentes para tratar a los gliomas, la efectividad de la quimioterapia por si sola sigue siendo un tema de discusión. En este sentido, la búsqueda de fármacos antineoplásicos que atraviesen la barrera hematoencefálica y lleguen al tumor en dosis efectivas sigue siendo un campo de activa investigación en la industria farmacéutica.

Para el tratamiento de gliomas el diagnóstico precoz del mismo constituye un paso limitante para la supervivencia del paciente. Con respecto al diagnóstico de los mismos, el perfeccionamiento progresivo de los estudios imagenológicos ha permitido el diagnóstico de tumores intracraneales pero en muchos casos en estadios avanzados. La aparición y el avance de las técnicas de imagenología a partir de los años 70 revolucionó el estudio del cerebro y permitió un mayor detalle anatómico de las estructuras SNC. Por ejemplo, la resonancia magnética nuclear (RMN) permite la detección de tumores y ofrece detalles morfológico de la lesión, demarca sus bordes, la forma, e incluso diferencia las distintas partes ocultas del tumor después del uso de contraste endovenoso. El desarrollo de la RMN angiográfica (RMNA) y funcional (RMNF) se han convertido en nuevas posibilidades diagnósticas, más certeras y menos invasivas. Más recientemente, la tomografía por emisión de positrones (PET) ha contribuido a diferenciar los gliomas de otras entidades tumorales, por lo que se ha convertido en el método diagnóstico por excelencia para la detección de los diferentes tipos de gliomas²². La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica que se basa en el uso de ligandos radiactivos (radiofármacos) que pueden marcar estructuras moleculares específicas en organismos vivos. Esta técnica de última generación ofrece la posibilidad de visualizar y cuantificar la actividad de las células en órganos específicos, aportando información directa acerca de la bioquímica y la función del área. La morfología es aportada por la tomografía computarizada incluida en las cámaras PET (PET/CT). Es así que la imagenología funcional con PET ha alcanzado un rol fundamental en el estudio de tumores de SNC a nivel mundial^{23,24}. Esta técnica está disponible en nuestro país desde el año 2009 en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

²¹ Omuro A, Beal K, et al. *Phase II Study of Bevacizumab, Temozolomide, and Hypofractionated Stereotactic Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2014, 20(19):5023-31.

²² Petrirena GJ, Goldman S, Delattre JY. *Advances in PET imaging of brain tumors: a referring physician's perspective*. Curr Opin Oncol., 2011, 23(6):617-23.

²³ Israel O, Keidar Z, Bar-Shalom R. *Positron emission tomography in the evaluation of lymphoma*. Semin Nucl Med. 2004. 34:166-79. Jacobs AH, Kracht LW, Gossman A, et al. *Imaging in neurooncology*. NeuroRx. 2005; 2:333–347.

²⁴ Messa C, Bettinardi V, Picchio M et al. *PET/CT in diagnostic oncology*. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2004. 48:66-75.

A pesar de todos los avances tanto en el área diagnóstica como terapéutica, los gliomas siguen siendo tumores generalmente de mal pronóstico y los pacientes muestran tendencia a reincidir y las neoplasias a mostrar una mayor agresividad cuando vuelven a parecer nuevamente. Neuropatólogos aseguran que incluso ha habido casos en donde un hemisferio cerebral entero ha sido removido con el tumor e igualmente se observó recurrencia^{25,26}. La naturaleza infiltrante, la falta de efectividad y limitaciones en la quimioterapia e incluso la modificación de la matriz extracelular²⁷ son factores relacionados con progresión del cáncer y la aparición de reincidencia. Al día de hoy, se reconocen múltiples aspectos que necesitan estudio y la relevancia de la investigación en el campo de terapia y diagnóstico de gliomas.

MODELOS ANIMALES DE CARCINOGENESIS

GENERALIDADES

El desarrollo de modelos representativos de los distintos tipos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*, es necesario para el entendimiento de cómo se desarrollan estos neoplasmas y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico.

En 1915, fue publicado el primer trabajo experimental en carcinogénesis química por el patólogo Katsusaburo Yamagiw, quién observó el desarrollo de papilomas y carcinomas en orejas de conejos luego de repetidas aplicaciones de alquitrán.²⁸ Desde ese entonces se ha observado un gran avance en el tema, siendo reflejo de eso el establecimiento de múltiples líneas celulares derivadas tanto de tumores humanos como de neoplasias inducidas en modelos animales de carcinogénesis. Aun cuando los modelos celulares *in vitro* facilitan la implementación de *screening* de alta eficiencia (*high-throughput screening*), que permiten evaluar una gran cantidad de compuestos con alta diversidad química, y el descubrimiento de genes implicados en la transformación de las células tumorales, los modelos animales siguen siendo imprescindibles. Al ser el cáncer una enfermedad muy compleja con interacciones intrincadas entre las células mutantes, células normales, elementos del estroma (tejido circundante y sus componentes) y el sistema inmune²⁹, modelos animales que sean representativos del desarrollo de la enfermedad son necesarios para ahondar en temas como angiogénesis y metástasis (difícilmente trasladables a ensayos en cultivo celular) y para profundizar en la aplicación de nuevas estrategias de terapia.

²⁵ Lassman AB, Holland EC. *Glioblastoma Multiforme - Past, Present, and Future*. US Oncology Review, 2005; 1(1):109-111

²⁶ Gardner WJ *et al.* *Residual functioning following hemispherectomy for tumour and for infantile hemiplegia*. Brain, 1955; 78(4): pp. 487-502.

²⁷ Payne LS, Huang PH. *The pathobiology of collagens in glioma*. Mol Cancer Res. 2013; 11(10):1129-40

²⁸ Oliveira PA, Colaco A, Chaves R., Guedes-Pinto H, De-la-Cruz L.; Lopes C. Chemical carcinogenesis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 2007, 79(4): 593-616.

²⁹ Hanahan, D & Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000, 100: 57-70.

Un buen modelo animal es aquel que tiene el balance entre la fidelidad al desarrollo de la enfermedad en humanos y las herramientas y conveniencia para el uso que el investigador le quiera dar. El modelo ideal mostraría una histopatología auténtica tal como se observaría en una muestra humana, incluyendo infiltración, angiogénesis y diseminación a distancia tal como se ve en los seres humanos a medida que progresa la enfermedad a través de estadios patológicos similares. Las vías de señalización prominentes en neoplasias humanas deberían de estar preservadas, así como la heterogeneidad tanto celular como molecular, a su vez las interacciones estromales deben ser fieles a sus homólogos humanos cuando sea posible, incluyendo la recapitulación de influencia del sistema inmunológico. Una vez que esos aspectos están cubiertos, el modelo ideal debería desarrollar neoplasmas en períodos de tiempo cortos, con una evolución predecible para un monitoreo exhaustivo con el cual sería fácilmente detectar cualquier cambio. Obviamente, no existe ningún modelo animal (ni tumor en humanos) que satisfaga estos requerimientos altamente demandantes, cada modelo *in vivo* tiene distintas ventajas y desventajas, así como distintos usos preferenciales. Es interesante como aún tan alejados de la idealidad los modelos animales han sido de vital importancia para generar información relevante, siendo netamente necesarios para conocer la biología de la enfermedad y para ayudar a la progresión de nuevos tratamientos mediante ensayos preclínicos.

Los primeros modelos animales fueron los de carcinogénesis química. Suministrando a animales ciertas sustancias químicas con propiedades de alterar la estructura del ADN introduciendo potencialmente mutaciones, se demostró el aumento la ocurrencia de neoplasias espontáneas respecto a animales control. Desde ese entonces la exposición a ciertos agentes ambientales como pueden ser químicos, radiación, virus patógenos o flora microbiana³⁰ han dado lugar a modelos que han sido de utilidad en varios estudios genéticos y preclínicos, así como para determinar el potencial carcinogénico o efecto quimiopreventivo de varios compuestos. La espontaneidad de los tumores que aparecen, así como el desarrollo de los mismos en animales inmunocompetentes y en un estroma no modificado hacen que aún a la fecha estos modelos sean de gran valor en la investigación científica. Sin embargo es evidente que hay ciertas limitaciones en los modelos de inducción por exposición a químicos u otros factores ambientales, como ser la latencia y penetrancia variable y muchas veces restricción en los tipos de tumor que pueden aparecer hacen difícil la indagación en ciertas problemáticas referentes a la enfermedad.

El desarrollo de modelos xenográficos (basados en el trasplante de tejidos o células de origen tumoral, que pueden ser incluso de origen humano) en la década del 70 permitió contar con tejido tumoral establecido *in vivo* en animales inmunodeprimidos de una forma fácil y rápida³¹. Si bien los modelos xenográficos permiten hacer un abordaje complementario a los modelos de inducción ambiental, a la hora de comparar

³⁰ Hardisty JF. *Factors influencing laboratory animal spontaneous tumor profiles*. Toxicol. Pathol., 1985, 13: 95–104.

³¹ Kendall SD, Adam SJ & Counter CM. *Genetically engineered human cancer models utilizing mammalian transgene expression*. Cell Cycle, 2006, 5: 1074–1079.

los tumores producidos por éste medio con tumores humanos derivados de pacientes, autóctonos del animal o inducidos espontáneamente por carcinogénesis química se ve una desviación de la arquitectura tumoral normal y menor heterogeneidad genética que es inherente en un tumor normal. Esas alteraciones en conjunto con la modificación del microambiente donde se desarrolla el tumor, incluyendo dentro de esto interacciones con otras células, vasculatura y sistema inmune^{32,33} pueden ser relevantes en la evaluación terapéutica de nuevos compuestos, pudiéndose perder concordancia entre resultados entre lo observado en modelos de trasplante de células y lo que se ve en la clínica³⁴. De hecho, autores determinan que estas limitaciones hacen que referirse a los xenográficos como modelos de carcinogénesis sea incorrecta, refiriéndose a ellos como una herramienta poderosa, aunque representaría un paso intermedio entre los cultivos celulares y los modelos animales³⁵.

Actualmente los modelos genéticamente modificados constituyen los modelos más sofisticados y muchos de ellos logran representar fielmente las características moleculares y fisiopatológicas de la enfermedad³⁶. Sus limitaciones están asociadas a cada modelo en particular, pero en general están relacionadas a la aparición de más de un tumor primario y la dificultad para producirlos.

MODELOS ANIMALES DE GLIOMA

La utilización de modelos *in vivo* aumenta el espectro de posibilidades a analizar en comparación a la información que se puede obtener de muestras de tejido de gliomas de pacientes. Se puede estudiar la formación del neoplasma (o gliomagénesis) desde un principio, identificando diferentes alteraciones y su efecto en el proceso, así como en la progresión del mismo. El propósito final con el que los modelos animales son elaborados es mejorar e implementar nuevas estrategias terapéuticas, permitiendo por ejemplo evaluar la acción de nuevos fármacos con resultados prometedores *in vitro*, moviéndose efectivamente al plano clínico.

³² Sikder H. *et al.* Disruption of *Id1* reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell*, 2003, 4: 291–299.

³³ Becher OJ & Holland EC. *Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies.* *Cancer Res.*, 2006, 66: 3355–3358.

³⁴ Johnson JI *et al.* Relationships between drug activity in NCI preclinical *in vitro* and *in vivo* models and early clinical trials. *Br. J. Cancer*, 2001, 84: 1424–1431.

³⁵ Frese KK, Tuveson DA. *Maximizing mouse cancer models.* *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(9):645–58.

³⁶ Jonkers J & Berns A. *Conditional mouse models of sporadic cancer.* *Nature Rev. Cancer*, 2002, 2: 251–265

Existen diversos organismos que han servido para recrear la enfermedad, existiendo incluso modelos no-mamíferos de glioma como *Drosophila melanogaster*³⁷, así como transgénicos y xenográficos de pez cebra (*Danio rerio*)^{38,39}. Dentro de los mamíferos, desde hace poco tiempo el ratón (*Mus musculus*) pasó a ser el modelo preferido, debido a la posibilidad de manipulación genética que el mismo ofrece, existiendo diversos modelos genéticamente modificados, que varían en sofisticación y fidelidad con la que recrean la patología humana. Los modelos de rata (*Rattus norvegicus*) en su mayoría no están genéticamente modificados, por lo que el *targeting* de una cierta vía y la exploración de interacciones tumor-estroma es más fácil de estudiar en con la flexibilidad genética de los modelos de ratón⁴⁰. Sin embargo, los modelos de rata tienen una gran utilidad y se han utilizado para probar numerosas modalidades de tratamiento y las técnicas de imagen a través de los años, ofreciendo ciertas ventajas frente al modelo de ratón. El tamaño del cerebro de la rata, más de tres veces mayor que el de ratón, puede llegar a tolerar volúmenes mayores a la hora de inyectar células; a su vez, su grueso cráneo posibilita explorar nuevas técnicas de trasplante y *delivery* de agentes terapéuticos y nuevos fármacos, algo imposible en los cráneos finos del ratón⁴¹.

Además de la inyección de células en individuos inmunocomprometidos existe un encare único de trasplante singénico en ratas, donde se inducen químicamente la aparición de gliomas en el donante y luego se transfiere por inyección estereotáxica parte de uno de esos gliomas a un receptor distinto, pero genéticamente idéntico, no habiendo casi riesgo de rechazo. Esto permite usar animales con su sistema inmune intacto. Cabe destacar que dicha posibilidad existe en ratas debido al amplio desarrollo que los modelos de inducción química de tumores gliales han tenido en estos organismos.

INDUCCIÓN QUÍMICA DE GLIOMAS

El desarrollo de modelos de inducción de tumores gliales por exposición a agentes químicos comenzó antes de la década del 70. Desde esa fecha, las nitrosoureas demostraron ser la mejor alternativa para inducir selectivamente la aparición de gliomas, los modelos inducidos por estos agentes alquilantes se encuentran entre los preferidos para la investigación neuro-oncológica en los campos de neuropatología, bioquímica,

³⁷ Read RD. *Drosophila melanogaster* as a model system for human brain cancers. *Glia*, 2011, 59(9): 1364–1376.

³⁸ Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CD., et al. *Tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors*. *PNAS*, 2005 102(2): 407–412.

³⁹ Yang XJ, Cui W, Gu A, Xu C, Yu SC, Li TT., et al. *A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion*. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61801.

⁴⁰ Reilly KM, Rubin JB, Gilbertson RJ, Garbow JR., Roussel MF & Gutmann DH. *Rethinking brain tumors: The fourth mouse models of human cancers consortium nervous system tumors workshop*. *Cancer Research*, 2008, 68(14) 5508–5511.

⁴¹ Saini M, Roser F, Samii M & Bellinzona MA *model for intratumoural chemotherapy in the rat brain*. *Acta Neurochirurgica*, 2004, 146(7): 731–734.

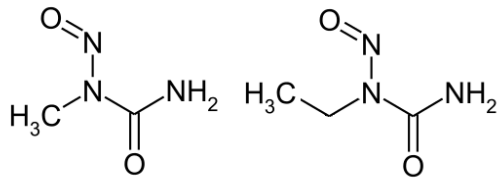


Figura 6. Estructura química de MNU y ENU, agentes más utilizados para la inducción de gliomas.

diagnóstico y terapia⁴². Existen varios modelos basados en la exposición de los animales a nitrosocompuestos como *N*-metilnitrosourea (MNU) o *N*-etilnitrosourea (ENU), cuya estructura química se visualiza en la **figura 6**, que conlleva a la alquilación de las bases del ADN en un proceso en varios pasos iniciado por la hidrólisis del carcinógeno bajo la influencia catalítica de un grupo tiol u otro electrófilo sin

la necesidad de participación de una enzima⁴³. El sitio de alquilación así como el mecanismo y tasa dependen en principal medida del agente alquilante en cuestión, en caso del MNU la posición O⁶ de la guanina es el blanco preferencial (**figura 7**), mientras que en el caso de ENU otras bases O-alquiladas se ven con la misma frecuencia. Durante la duplicación celular estos cambios en las bases promueven eventos mutagénicos por la adquisición de nuevas propiedades químicas que promueven apareamientos incorrectos (por ejemplo una O⁶-metilguanina se aparearía con una timidina, en vez de con una citosina), que pueden servir de punto de partida al proceso oncogénico⁴⁴.

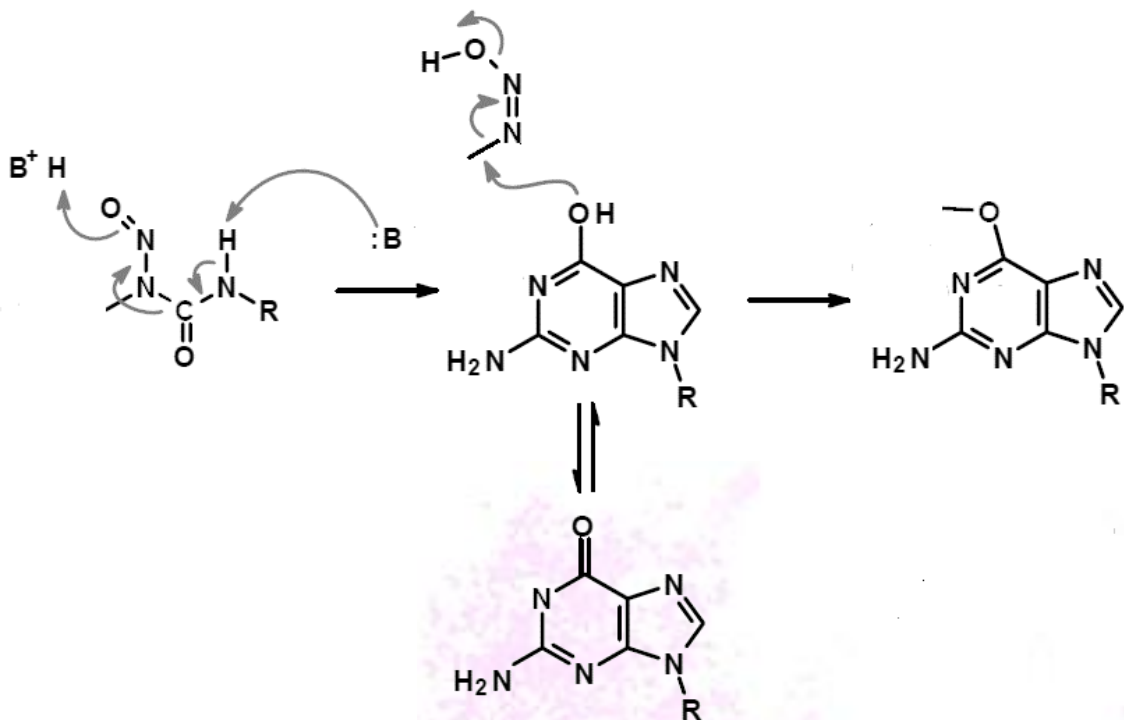


Figura 7. Posible mecanismo de metilación de la guanina en posición O⁶ por acción de MNU.

⁴² Bilzer T, Reifenger G, Wechsler W. *Chemical induction of brain tumors in rats by nitrosoureas: molecular biology and neuropathology*. Neurotoxicol Teratol. 1989; 11(6):551-6.

⁴³ Kleihues P, Rajewski MF. *Chemical neuro-oncogenesis: Role of structural DNA modifications, DNA repair and neural target cell population*. Prog. Exp. Tumor Res. 1984, 27:1-16.

⁴⁴ Loechler EL, Green CL, Essigmann GM. *In vivo mutagenesis by O⁶-methylguanine built into unique site in a viral genome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81:6271~5275.

Se ha postulado que el neurotropismo de estos agentes alquilantes es consecuencia de un mecanismo de reparación defectuoso que involucra directamente el mecanismo de acción de las nitrosoureas en el sistema nervioso, en donde la químicamente estable O⁶-alquilguanina no es rápidamente reparada tal como se observa en los demás tejidos del organismo⁴⁵. La carencia de un sistema, que involucra la presencia de proteínasceptoras de grupos alquilo que transfieren los grupos alquilo a un residuo de cisteína propio desde las guaninas modificadas, en el SNC podría explicar la acumulación de bases alteradas en el mismo y la selectividad con la que se induce el tumor mediante agentes como MNU y ENU⁴⁶.

Existen varios modelos inducidos por MNU y ENU que tienen características neuropatológicas similares a los gliomas malignos en humanos (pleomorfismo celular, actividad mitótica elevada, microvascularización, invasión local, necrosis) y que varían el tiempo de exposición, la forma de administración de carcinógeno y el momento en la vida del animal en el que es suministrado. Si bien hay modelos en donde es posible la inducción de gliomas en adultos, suministrado una dosis de 10ppm en el agua de la que beben las ratas en un intervalo de 20 semanas, apareciendo tumores con una latencia de 20 a 50 semanas⁴⁷; esto conlleva el uso sostenido de un agente altamente tóxico en el bioterio por largos períodos de tiempo, por lo que es difícil de implementar. Un modelo más popular, que involucra la utilización de mucho menos carcinógeno fue propuesto por Druckrey y colaboradores en 1966⁴⁸, el mismo se basa en la inyección intravenosa (**figura 8**) de una solución de ENU en una hembra preñada en el día 21 su gestación, exponiendo por vía transplacentaria a los fetos en un período sensible para el SNC ya que coincide con las etapas finales de diferenciación de la glía, esto sumado a la deficiencia en los mecanismos de reparación que hay en el SNC contribuye a que una única inyección en la madre provoque la aparición de neoplasias gliales en un 100% en un periodo que depende de la dosis de ENU suministrada⁴⁹. Si bien este modelo puede

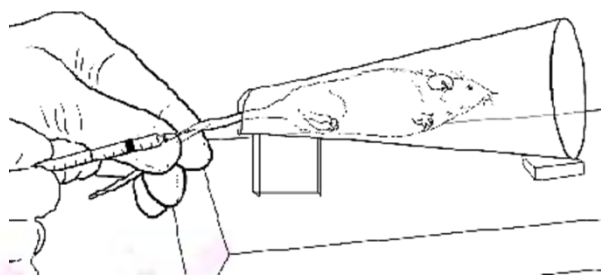


Figura 8. Esquema de administración del carcinógeno en el modelo de Druckrey y colaboradores⁴⁶

⁴⁵ Goth R, Rajewski MF. *Molecular and cellular mechanisms associated with pulsecarcinogenesis in the rat nervous system by ethyl-nitrosourea. Ethylation of nucleic acids and elimination of rates of ethylated bases from DNA of different tissues.* Z. Krebsforsch. 1974, 82:37-64

⁴⁶ Rajewski MF, Augenticht LH, Biessmann H, Goth R, Htilser DF, Laerum OD, Lomakina LY. *Nervous-systemspecific carcinogenesis by ethyl-nitrosourea in the rat: molecular and cellular aspects.* Orig. Hum. Cancer 1977; 12:709-725

⁴⁷ Rushing EJ, Watson ML, Schold SC, Land KJ, Kokkinakis DM. *Glial tumors in the MNU rat model: induction of pure and mixed gliomas that do not require typical missense mutations of p53.* J Neuropathol Exp Neurol. 1998 Nov;57(11):1053-60.

⁴⁸ Druckrey H, Ivankovic S, Preussmann R. *Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after a single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats.* Nature, 1966, 210: 1378-1379

⁴⁹ Zook BC, Simmens SJ. *Neurogenic tumors in rats induced by ethylnitrosourea.* Exp Toxicol Pathol. 2005; 57(1):7-14.

tener la desventaja de tener que administrarle el carcinógeno a una hembra gestante en estado delicado (no pudiendo poner a la misma bajo anestesia profunda por ejemplo), el mismo ha mostrado ser de amplia utilidad y ha sido utilizado a lo largo de los años para estudios de diversa índole como ser evaluación de nuevos agentes con fines diagnósticos⁵⁰ y evaluación del efecto terapéutico y quimiopreventivo de compuestos nuevos o compuestos ya conocidos⁵¹.

Una posibilidad que ofrecen estos modelos de carcinogénesis química es la de aislar y cultivar los diferentes fenotipos tumorales para disponer de modelos *in vitro* con directo correlato con el modelo *in vivo*. Varias líneas tumorales gliales han sido generadas a partir de tumores inducidos por nitrosocompuestos, por ejemplo a partir del modelo de inyección en hembras gestantes se generaron las líneas altamente invasivas RG2 y F98. La exposición repetida a MNU en distintas cepas de rata dio origen a distintas líneas como ser la CNS-1 (obtenida a partir de ratas Lewis), la 9L (derivada de un gliosarcoma desarrollado en ratas Fischer 344, siendo una de las mejores para trasplante) y C6 que no es tan buena para trasplantes por su alta inmugenicidad. La línea C6 deriva originalmente de un astrocitoma producido en ratas Wistar, las cuales fueron expuestas repetidas veces a MNU en un período de 8 meses⁵² y se caracterizan por su morfología fibroblastoide y su expresión incrementada de genes notablemente afectados en los tumores humanos del SNC como ser PDGF β , EGFR, IGF-1 y Erb3, mientras que p53 permanece sin alterar, por lo que resulta muy efectiva para testear nuevas terapias involucrando tanto sustancias químicas, radiación, virus oncolíticos, etc⁵³. Cabe destacar que la línea C6 es utilizada en este trabajo por las razones recientemente enumeradas.

⁵⁰ Kish PE, Blaivas M, Strawderman M, Muraszko KM, Ross DA, Ross BD, McMahon G. *Magnetic resonance imaging of ethylnitrosourea-induced rat gliomas: a model for experimental therapeutics of low-grade gliomas*. J Neurooncol. 2001, 53(3):243-57.

⁵¹ Ross DA, Kish PE, Muraszko KM, Blaivas M, Strawderman M. *Effect of dietary vitamin A or N-acetylcysteine on ethylnitrosourea-induced rat gliomas*. J Neurooncol. 1998, 40(1):29-38.

⁵² Benda P, Lightbody J, Sato G, et al. *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science. 1968, 161:370-371

⁵³ Barth RF, Kaur B. *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas*. J Neurooncol. 2009; 94(3):299-312.



ANTECEDENTES



ANTECEDENTES PROPIOS

Los flavonoides (**figura 9,10**) son un grupo extenso de compuestos derivados de metabolitos secundarios de las plantas, que además de jugar un rol fisiológico en las mismas poseen propiedades valiosas como ansiólisis y efecto antiinflamatorio, exhibiendo también actividad anticarcinogénica⁵⁴. Con respecto a su capacidad antitumoral se ha descrito en estos compuestos actividad antimetabólica⁵⁵ y/o inhibición de algunas enzimas como quinasas dependientes de ciclina⁵⁶, proteínas con actividad tirosina quinasa⁵⁷, topoisomerasas⁵⁸ o proteína quinasa C⁵⁹.

Nuestro grupo cuenta con experiencia en el trabajo con flavonoides sintéticos como entidades con actividad antitumoral y agentes con potencial quimiopreventivo para el cáncer debido a su acción como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos^{60,61}.

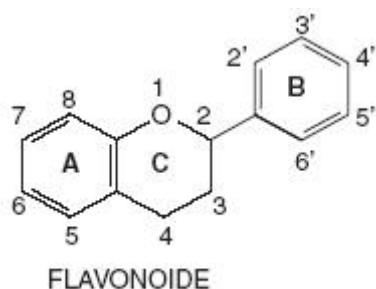


Figura 9. Estructura general de los flavonoides. Pueden ser considerados como fenilbenzo-pironas (fenilcromonas) compuesto de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C).

⁵⁴ Cárdenas M, Marder M, Blank VC, Roguin LP. *Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines*. Bioorg Med Chem. 2006; 14(9):2966-71

⁵⁵ Beutler, J.A.; Cardellina, J.H.; Lin, C.M.; Hamel, E.; Cragg, G.M.; Boyd, M.R. *Centaureidin, a cytotoxic flavone from *Polymnia fruticosa*, inhibits tubulin polymerization*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993, 3, 581–584.

⁵⁶ Sedlacek, H.H.; Czech, J.; Naik, R.; Kaur, G.; Worland, P.; Losiewicz, M.; Parker, B.; Carlson, B.; Smith, A.; Senderowicz, A.; Sausville, E.: *Flavopiridol, a new kinase inhibitor for tumor therapy*. Int. J. Oncol. 1996, 9, 1143-1168.

⁵⁷ Cushman M, Zhu H, Geahlen RL, Kraker AJ. *Synthesis and biochemical evaluation of a series of aminoflavones as potential inhibitors of protein-tyrosine kinases p56lck, EGFr, and p60v-src*. J Med Chem. 1994; 37(20):3353-62.

⁵⁸ Yamashita Y, Kawada S, Nakano H. *Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol*. Biochem Pharmacol. 1990; 39(4):737-44.

⁵⁹ Ferriola PC, Cody V, Middleton E Jr. *Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships*. Biochem Pharmacol. 1989; 38(10):1617-24.

⁶⁰ Cabrera M, Lavaggi ML, Croce F, Celano L, Thomson L, Fernández M, Pintos C, Raymondo S, Bollati M, Monge A, López de Ceráin A, Piro OE, Cerecetto H, González M. *Identification of chalcones as in vivo liver monofunctional phase II enzymes inducers*. Bioorg Med Chem. 2010; 18(14):5391-9

⁶¹ Cabrera M, Simoens M, Falchi G, Lavaggi ML, Piro OE, Castellano EE, Vidal A, Azqueta A, Monge A, de Ceráin AL, Sagrera G, Seoane G, Cerecetto H, González M. *Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships*. Bioorg Med Chem. 2007, 15: 3356-67.

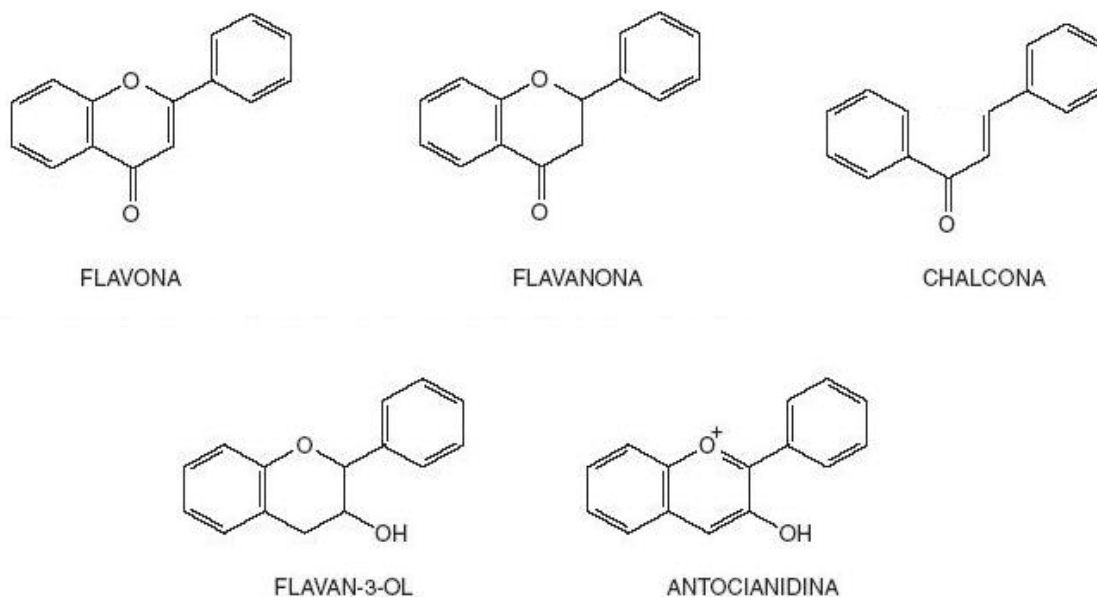


Figura 10. Principales tipos de flavonoides. Los mismos se agrupan según sustituyentes presentes en las tres estructuras cíclicas.

Por otro lado, dentro de la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos el Grupo de Química Medicinal ha ahondado a su vez en el trabajo con derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina, que combinan dos agrupamientos químicos bioactivos. Por un lado, un sistema biorreducible –la función *N*-óxido- y por otro una estructura plana –el sistema fenazina que potencialmente podría interactuar con el ADN (**figura 11**), habiéndose observado resultados prometedores *in vivo* y caracterizado su mecanismo de acción y otras propiedades prometedoras como potenciales fármacos^{62,63}.



Figura 11. Bio-reducción de los profármacos de *N,N'*-dióxidos de fenazina.

⁶² Lavaggi ML, Cabrera M, Aravena Mde L, Olea-Azar C, López de Ceráin A, Monge A, Pachón G, Cascante M, Bruno AM, Pietrasanta LI, González M, Cerecetto H. *Study of benzo[a]phenazine 7,12-dioxide as selective hypoxic cytotoxin-scaffold. Identification of aerobic-antitumoral activity through DNA fragmentation.* Bioorg Med Chem. 2010, 18: 4433-40.

⁶³ Lavaggi ML, Cabrera M, Pintos C, Arredondo C, Pachón G, Rodríguez J, Raymondo S, Pacheco JP, Cascante M, Olea-Azar C, López de Ceráin A, Monge A, Cerecetto H, González M. *Novel Phenazine 5,10-Dioxides Release •OH in Simulated Hypoxia and Induce Reduction of Tumour Volume In Vivo* ISRN Pharmacol., 2011.



OBJETIVO



OBJETIVO GENERAL

Contribuir en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial quimioterápico para el uso en gliomas y optimización de herramientas *in vivo* que permitan testar de forma rápida y económica potenciales fármacos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selección a partir de nuestra propia Quimioteca de 15-20 moléculas pertenecientes a la familia de los flavonoides y de los *N,N'*-dióxido de fenazina con actividad antitumoral previamente descrita en otros modelos tumorales.
2. Utilización de un método de tamizaje eficiente para la identificación a dosis fija de compuestos citotóxicos en una línea celular derivada de glioma de rata.
3. Selección de los compuestos que resulten más activos en la actividad previa y determinación de su perfil dosis-respuesta y correspondiente IC₅₀.
4. Utilización de cultivos primarios de astrocitos para determinación de un índice de selectividad citotóxica (IS) de los compuestos seleccionados en el objetivo 3.
5. Incursión en la optimización de un *modelo in vivo* de glioma mediante carcinogénesis química.





MATERIALES Y MÉTODOS

GENERALIDADES

Se obtuvieron de Sigma, Tripsina-EDTA, Penicilina-Estreptomicina (P/E), tampón fosfato salino (PBS) sin calcio ni magnesio. El medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium) y el Suero Fetal Bovino (SFB) se obtuvieron de Gibco (Carlsbad, EUA).

Las medidas de pH se efectuaron en un equipo Orion pHmeter Model 420A. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en un equipo Sigma 3K18. Se utilizó un microscopio láser confocal Olympus BX61, módulo confocal FV300. El lector de placas empleado fue Thermo, Varioskan Flash.

Para los estudios con animales se utilizaron ratas Sprague-Dawley *wild type* alimentadas con ración LabDiet®, agua *ad libitum* en una habitación con temperatura y humedad controlada y un ciclo de 12hs-luz/12hs-oscuridad. Las mismas fueron mantenidas por el personal encargado del bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Todos los procedimientos utilizados fueron previamente publicados y aprobados por el comité de ética del IIBCE y bajo la ley de experimentación animal No 18.611.

APROXIMACIONES *IN VITRO*.

Obtención de cultivo primario de astrocitos de corteza.

Para la realización del cultivo primario (cultivo proveniente de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado) de astrocitos corticales se siguió el protocolo descrito por Saneto y De Vellis con mínimas modificaciones^{64,65}.

Neonatos (P1) de rata fueron anestesiados por hipotermia, para luego realizar la disección de corteza cerebral en hielo. La misma luego de ser cortada en pequeños trozos con bisturí fue disgregada enzimáticamente con tripsina 0,25% en buffer libre de calcio por 5 min a 37°C (que contiene además EDTA para desestabilizar las uniones intercelulares y las uniones célula-matriz, favoreciendo la interacción de la tripsina para la degradación de dichas proteínas de adhesión), se procedió a detener el tratamiento agregando DMEM-10 % v/v SFB en presencia de ADNasa en una concentración de 50 µg/mL, los componentes presentes en el medio complementado actúan inhibiendo la tripsina, mientras que la ADNasa disminuyendo la formación de agregados celulares durante el proceso de disgregación al romper el ADN

⁶⁴ De Vellis J, Wu DK and Kumar S: *Enzyme induction and regulation of protein synthesis. In: Astrocytes: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology of Astrocytes. Vol.2.* (Fedoroff S and Vernadakis A, eds). Academic Press, INC; Orlando, Florida, 1986, pp 209-237.

⁶⁵ Cassina P, Peluffo H, Pehar M, et al. *Peroxynitrite Triggers a Phenotypic Transformation in Spinal Cord Astrocytes That Induces Motor Neuron Apoptosis.* J Neurosci Res., 2002, 67:21–29.

libre proveniente de las células lisadas. Posteriormente se disgrega mecánicamente mediante pipeteo. El extracto obtenido se pasó por una malla de 80 μm para eliminar detritos y luego se centrifuga, el *pellet* obtenido se resuspende en medio de cultivo (DMEM suplementado con 10 % v/v SFB, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina, tamponado con HEPES) y se plaquea. Tras el plaqueo se remueve el medio a las 72 hs de ser incubado y mantenido inmóvil (para la correcta adhesión de las células) y luego se reemplaza cada 48hs. Se obtuvo en una semana un cultivo de glía mixto, pudiéndose remover los oligodendrocitos y microglía por agitación durante 48 hs en agitador orbital a 180 rpm y 37°C. Después de 21 días en cultivo las monocapas de astrocitos muestran una pureza mayor al 95%, evidenciada mediante inmunocitoquímica para GFAP (proteína ácida fibrilar glial).

Criopreservación/Revitalización.

Para la conservación de las línea celular se utilizó una mezcla crioprotectora que consiste en 10% DMSO y 90% SFB, el DMSO actúa como agente criopreservante ya que es permeable a través de la membrana y puede desplazar parte del agua del interior de la célula evitando así la formación de cristales de hielo intercelulares los cuales pueden dañar las estructuras de la misma, provocando incluso su destrucción. El enfriamiento se llevó a cabo en cámara que utiliza isopropanol y permite realizar un enfriamiento progresivo de 1 °C por minuto (Nalgene), para que la formación de los cristales intracelulares sea lo menos dañina posible.

Las células en fase de crecimiento exponencial fueron tripsinadas, contadas y centrifugadas a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el volumen necesario de mezcla crioprotectora para obtener una concentración entre 2 y 3×10^6 cell/mL. Se dispensaron entre 1-1,5 mL de la suspensión celular por criotubo, los cuales fueron almacenados en la cámara de congelación en un freezer de -80 °C.

Para el descongelado y revitalización se colocó un criotubo en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo cónico que contenía 10 mL de medio de cultivo a 37 °C y se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo y se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar cantidad y viabilidad de las células recuperadas. Finalmente, las células fueron sembradas en botellas de 25cm².

Mantenimiento de líneas celulares y cultivos primarios.

Tanto la línea celular C6 (ATCC® CCL-107, derivada de astrocitoma de rata) como los cultivos primarios de astrocitos corticales se cultivaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ (dicho porcentaje es necesario para tamponar el pH del medio que contiene bicarbonato). Para ambas, se utilizó medio DMEM suplementado con 10 % v/v SFB descomplementado en presencia de 100 U/mL de penicilina y 100

μg/mL de estreptomicina. La descomplementación del SFB empleado para suplementar los medios se efectuó durante 40 minutos en un baño de agua termostatzado a 56 °C.

Todas estas células poseen crecimiento en adherencia y para el mantenimiento en cultivo se emplearon botellas de 25 o de 75 cm² realizando pasajes en el caso de la C6 mediante tripsinización cada vez que alcanzaron la confluencia y por un máximo de 10 pasajes. La línea celular se utilizó entre los pasajes 5 y 10 mientras que el cultivo primario se utilizó en cuanto alcanzo el 95% de pureza, no realizándose pasajes previos. Para despegar las células mediante tripsinización se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa con PBS y se adicionó Tripsina-EDTA. Las células fueron incubadas durante 5 min a 37 °C, se adicionó medio de cultivo completo y se transfirió la dilución adecuada a una nueva botella de cultivo o a las placas correspondientes.

Recuento y evaluación de viabilidad celular.

Se realizó el recuento celular en cámara de *Neubauer* empleando las diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. La concentración de células viables se determinó empleando el método de exclusión con Azul de Tripán en el cual el colorante se incorpora en las células muertas debido a la alteración de la integridad de la membrana plasmática. Las muestras obtenidas de los cultivos fueron incubadas con una solución de Azul de Tripán 0,5% en PBS y sembradas en la cámara.⁶⁶

Análisis de citotoxicidad

Se empleó el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B⁶⁷, diseño utilizado por el *National Cancer Institute*, USA (NCI, por sus siglas en inglés)^{67,68}, en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad antitumoral que sean específicos de una línea o conjunto de líneas celulares. Este ensayo se basa en la determinación del contenido proteico de las células tras haber sido fijadas las células vivas y removidas las células no viables. Tiene la ventaja de ser altamente sensible y de funcionar exactamente igual en todas las líneas celulares, ya que no depende de ninguna actividad enzimática intrínseca⁶⁹.

Se emplean placas de 96 pocillos de fondo plano, se siembra un número adecuado de células, según lo que se esté trabajando (10000 células por pocillo para C6 y 15000 para astrocitos, cantidad necesaria para

⁶⁶ Strober W. *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr. Protocol. Immunol. 1997, 21: A.3.B.1-A.3.B2.

⁶⁷ Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82: 1107-1112.

⁶⁸ Suggitt M, Bibby MC. *50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches*. Clin. Cancer Res., 2005, 11: 971-981.

⁶⁹ Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. *Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing*. Eur J Cancer. 1991;27(7):897-900.

alcanzar 90% de confluencia a las 48 hs) en 100 μ L de medio para facilitar la adherencia de las mismas. Los cultivos se mantienen en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. A las 24 horas se agrega 125 μ L de medio fresco. A las 24 h se añade 25 μ L por pocillo del producto a ser testeado en una concentración 10 veces mayor a la deseada disuelto en una solución de DMSO al 10 %, de forma de obtener la concentración correcta en los 250 μ L finales en cada pocillo (cada concentración se ensaya por cuatuplicado intraensayo). La duración del tratamiento con el compuesto es de 24 horas en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. Una vez tratadas las células, se elimina el medio junto con el producto y se lavan los pocillos dos veces con 200 μ L de PBS tibio o a temperatura ambiente para no favorecer que se despeguen las células que no se desprendieron del plástico (células que resistieron el tratamiento con el compuesto a esa concentración). Las células se fijan con 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 50 % v/v y 200 μ L de medio de cultivo (sin suero fetal bovino) durante una hora a 4 °C, esta solución fija las células vivas debido a la acción del TCA que actúa por precipitación. Posteriormente se decantan y se lavan 5 veces con agua destilada. A continuación se añaden a cada pocillo 100 μ L de una solución de sulforrodamina B al 0,4 % v/v en ácido acético al 1 % y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se lavan las placas 5 veces con 200 μ L de ácido acético al 1 % v/v y se dejan secar durante toda la noche. El colorante que permanece en el pocillo debido a la presencia de proteínas de origen celular se disuelve en 100 μ L de Tris base 10 mM, pH 10, se agitan las placas para total disolución y se realiza la lectura en espectrofotómetro a 540 nm. El porcentaje de supervivencia se calcula como $T/C \times 100$ (T Abs células tratadas, C Abs células control).

Uso de quimioteca propia.

Compuestos de una quimioteca propia pertenecientes a la familia de los flavonoides y fenazinas fueron seleccionados por la actividad citotóxica mostrada anteriormente a una dosis fija de 100 μ M en otras líneas celulares tumorales^{61,62,63}. Los mismos fueron entonces evaluados en la línea tumoral C6 a una dosis fija de 25 μ M, siendo los compuestos con mayor citotoxicidad evaluados posteriormente para determinar su perfil dosis-respuesta. Se determina el IC₅₀ (concentración que produce 50 % de citotoxicidad) para cada uno de esos compuestos tanto en células de glioma de rata como en astrocitos primarios de corteza. El índice de selectividad (IS) luego se determinó como el cociente entre el IC₅₀ en astrocitos primarios y el IC₅₀ en C6.

Análisis estadístico.

Los datos se describen como la media \pm el desvío estándar (SD) de al menos dos o tres experimentos independientes, a no ser que se especifique otra forma. Cada condición fue realizada por duplicado o triplicado en cada ensayo, con la excepción de aquellos casos donde se especifiquen otras condiciones.

Los parámetros hallados fueron expresados como el valor calculado \pm el error absoluto obtenido mediante propagación de errores.

APROXIMACIONES *IN VIVO*.

INCURSIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE INDUCCIÓN DE GLIOMA

Inyecciones en cisterna magna.

Se utilizan 8 neonatos (P1) provenientes de una misma camada en este procedimiento. Se seleccionan dos machos y a dos hembras para ser tratados con 5 μ L de una solución de MNU 2mM (alcanzando en un volumen estimado de 100 μ L de líquido cefalorraquídeo una concentración de 150 μ M). Se seleccionaron otros dos machos y otras dos hembras como control, siendo inyectados solamente con vehículo (PBS). Ésta selección se realizó para evitar variabilidad de sexo, minimizándose también la variabilidad genética al utilizar animales provenientes de la misma camada. El esquema de trabajo se muestra en la **figura 12**.

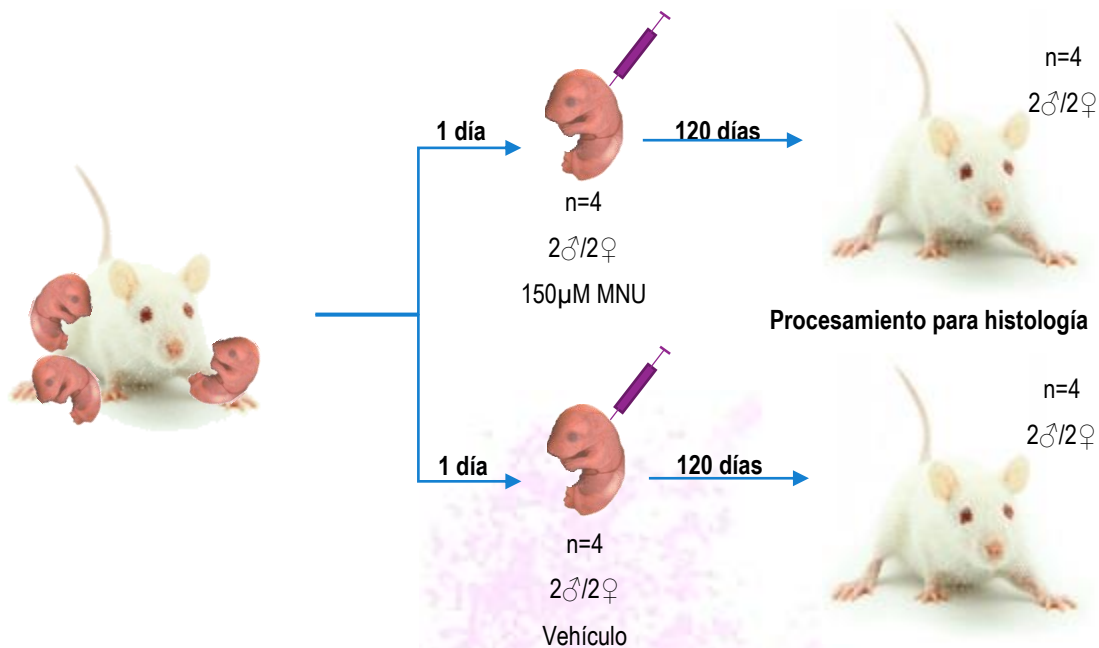


Figura 12. Esquema de trabajo con animales.

Para la inyección en la cisterna magna se introdujo una aguja 30 G X 1" (de uso odontológico) en una trayectoria vertical, perforando piel y músculo, hasta que se atraviesa la membrana atlanto-occipital. La aguja fue modificada para que tuviera un tope, de manera que no perforase más de 2mm que en animales de esa edad está corroborado que se inyecta en la cisterna magna sin tocar ninguna región importante que pueda condicionar posteriormente el desarrollo de los neonatos. Una vez que se perfora la membrana

atlanto-occipital se le suministraron a los animales la solución de carcinógeno o de vehículo según pertenecieran al grupo a tratar o al grupo control.

Perfusión y disección de tejido.

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (90:10 mg/Kg), cuya seguridad ha sido probada para procedimientos de imagen y no se ha demostrado que cause cambios significativos en el flujo sanguíneo cerebral, siendo esta combinación de un anestésico disociativo con un sedante suficiente para producir un nivel de anestesia profunda en la rata para realizar la perfusión con el fin de fijar los tejidos para así conservar la integridad de los mismos. El método utilizado para la fijación fue la perfusión intracardiaca, en donde la solución fijadora, paraformaldehído al 4%, se introduce a través del sistema circulatorio por el cual accede a los distintos tejidos gracias a la red de capilares. El PAF es un fijador por entrecruzamiento, es decir que actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares y se usa a una concentración estándar de 4% en PBS, aunque puede usarse hasta en un 10%.

Para la perfusión luego de anestesiado el animal se colocó bajo campana de extracción y se procedió a hacer una incisión abdominal por debajo del reborde costal, el diafragma fue seccionado y el costillar cortado por ambos lados, pudiendo retirar así parte del mismo. Una vez expuesto el corazón se cortó la aurícula derecha y se pinchó el ventrículo izquierdo con una aguja estéril para que por el ingresen los líquidos perfundidos mediante una bomba peristáltica. En una primera instancia se perfunde una solución salina (NaCl 0,9%) con anticoagulante (citrato de sodio 0,4%) para asegurar que no se formen coágulos que impidan la circulación de líquido a una zona de tejido, luego de haberse sustituido la sangre del animal con solución salina se procedió a administrar la solución fijadora (PAF 4% en PBS). Una vez fijados los animales, se disecaron los cerebros y se mantuvieron en PAF 4% a 4°C durante 24 horas para terminar de fijar por inmersión debido al tamaño del órgano en cuestión y su pobre irrigación, también se siguió el mismo procedimiento con la médula espinal. Luego se preservaron los tejidos en PBS- Azida 0.05% y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento, impidiendo que haya contaminación gracias a la acción de la azida de sodio.

Obtención de cortes sagitales y coronales de cerebro.

Los cortes se realizaron con un vibrátomo Leica 1000s, el cual permite realizar cortes en material fijado. La cuchilla del vibrátomo, además de avanzar sobre la muestra, posee un movimiento de vibración lateral a modo de sierra que facilita el corte y evita arrastrar el tejido. Antes de cortar, se adhirieron las secciones coronal y sagital de los cerebros con un adhesivo instantáneo, luego se seleccionó un espesor de 50 µm para realizar cortes seriados a una velocidad de 6.0 mm/segundos y una frecuencia a 6.0 Hz. Los cortes se recogen en flotación en PBS-Azida de sodio 0.05 % para su posterior procesamiento.

Análisis histológico por microscopía láser confocal y de Nomarski.

Se seleccionaron al azar 1 corte representativo de varias series de 10 obtenidas para cada cerebro cortado coronalmente (promedio 18 series de 10 para cada cerebro cortado coronalmente) y de series de 30 para el cerebro cortado sagitalmente (se obtuvieron 7 series para el mismo). Los cortes en cuestión fueron montados en portaobjetos empleando un medio montaje glicerol 50% - DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) 1µg/mL y son visualizados en el microscopio láser confocal excitando la muestra con luz ultravioleta ($\lambda=405\text{nm}$) para después ser detectado a través de un filtro azul/cian ya que la muestra tiene un máximo de emisión a 461nm. Mediante el empleo de DAPI (sonda que interacciona con el ADN y que es capaz de atravesar las membranas celulares) se pretendió realizar una localización de estructuras y un *screening* rápido de posibles anomalías evidenciadas por una histoarquitectura atípica.

La microscopía láser confocal es un tipo de microscopía óptica, en donde se hace pasar luz a través de lentes ópticos para obtener una imagen ampliada de la muestra, en este caso la luz que atraviesa la muestra es monocromática y la imagen se visualiza gracias a la emisión de un fluoróforo asociado a la muestra que es excitado por la luz monocromática. El análisis por microscopía láser confocal permite obtener imágenes digitalizadas con buena resolución y gran contraste debido a la eliminación de la luz proveniente de regiones fuera de foco. Además debido a capacidad del mismo de realizar "cortes ópticos" gracias a la existencia del *pinhole* (apertura que se encuentra frente al fotomultiplicador y no permite pasaje de fluorescencia de las regiones que no están en foco) se puede hacer un análisis y reconstrucción 3D de la muestra variando el plano de enfoque del sistema.

A su vez se analizaron los cortes por microscopía de contraste interferencial de Nomarski en el mismo microscopio. Ésta técnica emplea filtros polarizantes y prismas para producir imágenes de buena resolución y contraste que ayudan a discernir tanto detalles superficiales como estructuras internas, sin necesidad de teñir las muestras.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



APROXIMACIONES IN VITRO

SELECCIÓN DE COMPUESTOS DE QUIMIOTECA PROPIA

Como se mencionó en la sección anteriores en este trabajo se seleccionaron para evaluar su potencial citotóxico frente a modelos celulares gliales compuestos provenientes de una quimioteca propia. En especial se optó por evaluar derivados de flavonoides y fenazinas que previamente habían mostrado algún tipo de actividad antitumoral en otros modelos evaluados por nuestro grupo en estudios previos. Para la selección de flavonoides se utilizaron los compuestos sintetizados y evaluados por Cabrera *et al*⁶¹ sobre las líneas tumorales MCF-7, HT-29 y TK-10 (ver **figura 13** y **tabla 2**).

En un principio el NCI (National Cancer Institute, EEUU) como parte de su programa de descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales implementó un ensayo *in vitro* para el *screening* de potenciales quimioterápicos. El mismo consistía en evaluar sobre un panel de 60 líneas celulares de diverso origen tisular, incluyendo siete tipos de cánceres (cerebro, colon, leucemias, pulmón, melanoma, ovario y renal), midiéndose su capacidad citotóxica. Aproximadamente 85.000 compuestos fueron ensayados en el panel de 60 líneas celulares, algunos de los cuales se utilizan hoy en clínica como el Taxol. En 1999, se introdujo un método que utilizaba una combinación de tres líneas celulares altamente sensibles, generalmente MCF-7 (carcinoma de mama, receptor de estrógeno positiva), NCI-H460 (carcinoma de pulmón) y SF-268 (glioma), o MCF-7, HT-29 (adenocarcinoma de colon) y TK-10 (carcinoma renal). Este ensayo surge porque el 85% de los compuestos evaluados hasta ese entonces por el NCI, utilizando el tradicional panel de 60 líneas celulares, no mostraban actividad antiproliferativa en estas líneas. De esta forma, utilizando este *screening in vitro* a escala laboratorio se es más eficiente removiendo compuestos inactivos sin necesidad de una evaluación a gran escala más costosa como lo era con el panel de 60 líneas ^{70,71}.

Las fenazinas consideradas para su evaluación (ver **figura 13** y **tabla 2**) en células gliales fueron sintetizadas y evaluadas previamente por Lavaggi *et al*. El procedimiento para la evaluación de las mismas *in vitro* es un ensayo de clonación en la línea celular V-79 (fibroblastos de pulmón de hámster chino) simulando condiciones de hipoxia típicas del núcleo de tumores sólidos y normoxia para determinar selectividad durante el tratamiento de las células. Los compuestos con prometedora actividad *in vitro* fueron sometidos a estudios posteriores, llegando incluso a mostrar efectividad *in vivo* y a dilucidarse su mecanismo de acción^{62,63}.

⁷⁰ Shoemaker RH. *The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen*. Nat Rev Cancer, 2006, 6, 813-823.

⁷¹ Suggitt M, Bibby MC. *50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches*. 2005, Clin Cancer Res 11, 971-981.

Los compuestos elegidos según los criterios enumerados y de acuerdo a su disponibilidad se muestran en la **figura 13**. Aquellos que exhibieron mayor actividad en las líneas tumorales designadas por el NCI en el caso de los flavonoides y mejor desempeño en hipoxia e *in vivo* para las fenazinas (**tabla 2**), así también se incluyeron compuestos con cierta analogía estructural con el fin de evidenciar relaciones estructura actividad interesantes si las hubiera.

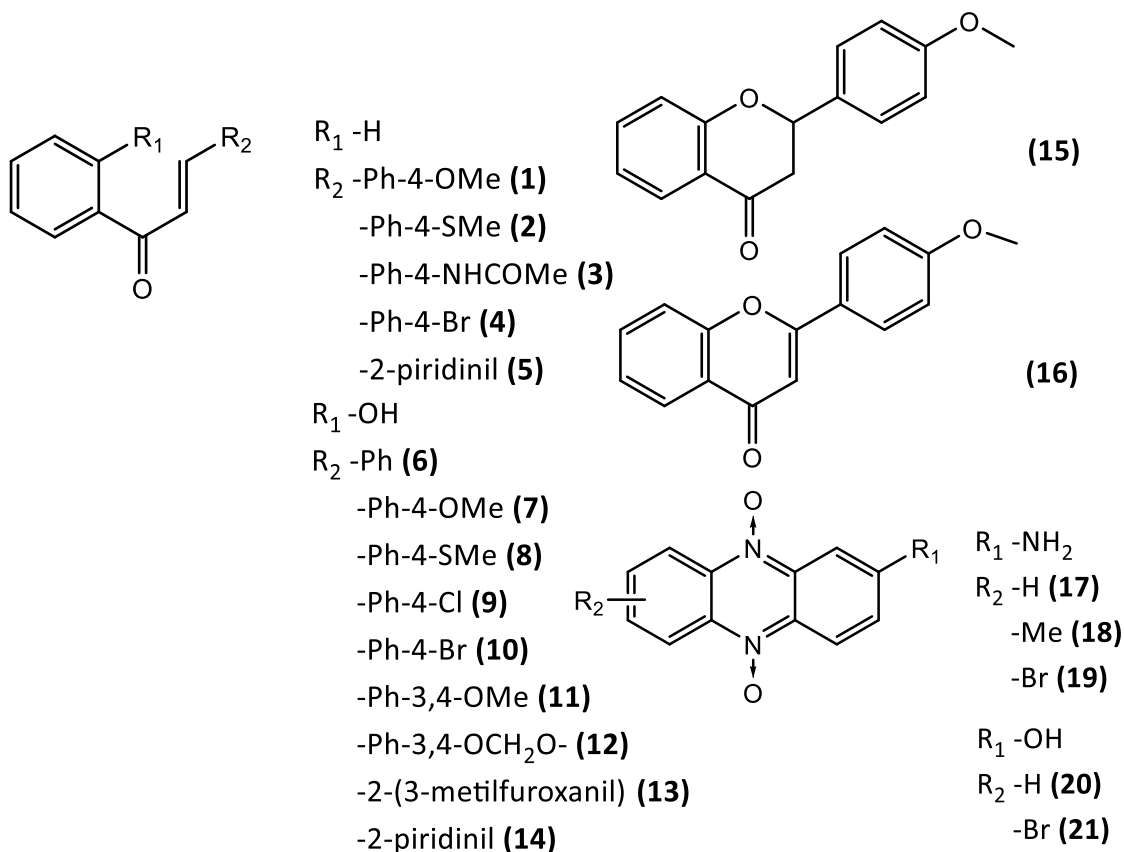


Figura 13. Compuestos seleccionados a partir de nuestra quimioteca para ser evaluados en la línea tumoral glial.

Además de seguir el criterio fijado anteriormente, con el fin de encontrar determinantes estructurales que se relacionen con su actividad se eligió inicialmente evaluar derivados análogos entre sí que diferían únicamente en el anillo C: cíclico o no y con diferentes grados de oxidación. Así con el fin de evaluar el efecto del esqueleto carbonado se evaluaron chalconas, hidroxichalconas, flavonas y flavanonas (ver **figura 13**). Específicamente la chalcona **1** con buena actividad antitumoral frente a las tres líneas y a su correspondiente hidroxichalcona (**7**), así como su flavanona (**15**) y flavona (**16**) análoga a pesar de que no haya tenido potencial citotóxico en los estudios previos. De todos los flavonoides evaluados, la mayoría pertenece a la familia de las chalconas e hidroxichalconas dado que habían mostrado mejor perfil citotóxico en las líneas MCF-7, HT29 y TK10. Entonces ahora serán probadas en la línea tumoral glial C6, derivada de un astrocitoma de rata inducido por MNU. Además se seleccionaron chalconas portadoras de varios sustituyentes con el fin de evaluar el efecto de los mismos.

Las fenazinas **19** y **21** mostraron reducir el tamaños de tumores de mama inducidos químicamente⁶¹, a su vez junto con **18** demostró ser citotóxica por su capacidad de producir radicales hidroxilo. **17** y **20** no portan sustituyente en R₂ y podrían dar lugar a discusión de la importancia de los sustituyentes en caso de mostrar resultados interesantes.

Tabla 2. Toxicidad en células tumorales de los compuestos seleccionados de la quimioteca.

Compuesto	Porcentaje de Supervivencia a 100 μM^{*1}		
	TK-10	MCF-7	HT-29
1	2	30	2
2	0	47	46
3	5	24	3
4	90	44	28
5	-	-	-
6	0	3	14
7	4	10	97
8	91	75	76
9	3	41	25
10	60	43	71
11	2	1	70
12	50	79	69
13	-	-	-
14	1	4	15
15	36	2	100
16	100	100	100

Compuesto	P _{hipoxia} (μM) ^{*2}
	V-79
17	-
18	25
19	12
20	-
21	10

¹ El porcentaje de supervivencia se calcula como T/C x 100, T - Abs células tratadas, C - Abs células control

² Dosis a la cual se observa un porcentaje de supervivencia del 1% en células en hipoxia.

CITOTOXICIDAD EVALUADA A DOSIS FIJA

Luego de seleccionar los compuestos se procedió a evaluar a los mismos en la línea C6, derivada de astrocitoma de rata. La elección de la misma radicó en que Benda y colaboradores lograron aislar dicha línea a partir de un modelo animal de glioma inducido químicamente con MNU⁵², agente carcinógeno que se pretende usar en este trabajo y *a posteriori* para trabajar con los modelos de tumorigénesis glial *in vivo*. C6 no sólo sobreexpresa un set de receptores y proteínas presentes en la patología humana que podrían ser blanco de posibles fármacos sino que ha demostrado ser un modelo *in vitro* con cierto correlato con el modelo *in vivo*⁵³.

Debido a que la mayoría de los compuestos seleccionados demostraron ser citotóxicos a una dosis de 100 μM (dosis de la que parte el NCI para los *screening* en líneas), con el fin de realizar un cribado antes de determinar otros parámetros de manera de seguir con los mejores compuestos, la línea celular C6 fue sometida a un tratamiento con una dosis cuatro veces menor, 25 μM de cada compuesto. La dosis fue fijada arbitrariamente (teniendo en cuenta que era considerablemente menor a la dosis fijada para los ensayos con las otras líneas celulares humanas) con el objetivo de encontrar al menos cinco compuestos que exhibieran un potencial citotóxico considerable a 25 μM . Los resultados de la evaluación a dosis fija se muestran en la **tabla 3**, la citotoxicidad se expresa como el porcentaje de supervivencia (%Sup) que corresponde al porcentaje de células vivas respecto al control tratado solo con DMSO.

Tabla 3. Porcentajes de supervivencia observados tras 24hs de tratamiento con los compuestos seleccionados a una concentración de 25 μM

Compuesto	%Sup a 25 μM	Compuesto	%Sup a 25 μM
	C6		C6
1	55 \pm 3	12	86 \pm 5
2	16 \pm 2	13	7 \pm 2
3	22 \pm 3	14	19 \pm 1
4	2 \pm 1	15	40 \pm 2
5	58 \pm 4	16	41 \pm 7
6	43 \pm 5	17	60 \pm 5
7	64 \pm 5	18	72 \pm 4
8	59 \pm 4	19	68 \pm 3
9	3 \pm 1	20	95 \pm 4
10	97 \pm 6	21	28 \pm 2
11	34 \pm 4		

Lo primero que se observa es que la mayoría de los compuestos demuestran tener actividad citotóxica frente a esta línea celular a una concentración mucho más baja que la evaluada anteriormente que se correspondía con el punto de partida del NCI para hacer el *screening* de compuestos con actividad antitumoral, un 80% de los compuestos evaluados mostró una citotoxicidad de al menos 40% siendo además su actividad farmacológica representativa ya que presentaron una buena solubilidad a 25 μM .

Se destaca la acción de seis flavonoides de la familia de las chalconas (los compuestos **2**, **3**, **4**, **9**, **13**, **14**) cuyo tratamiento a 25 μM por 24 horas fue suficiente para provocar la muerte de un 80% o más de las células de glioma. Los mismos se muestran en la **figura 14**.

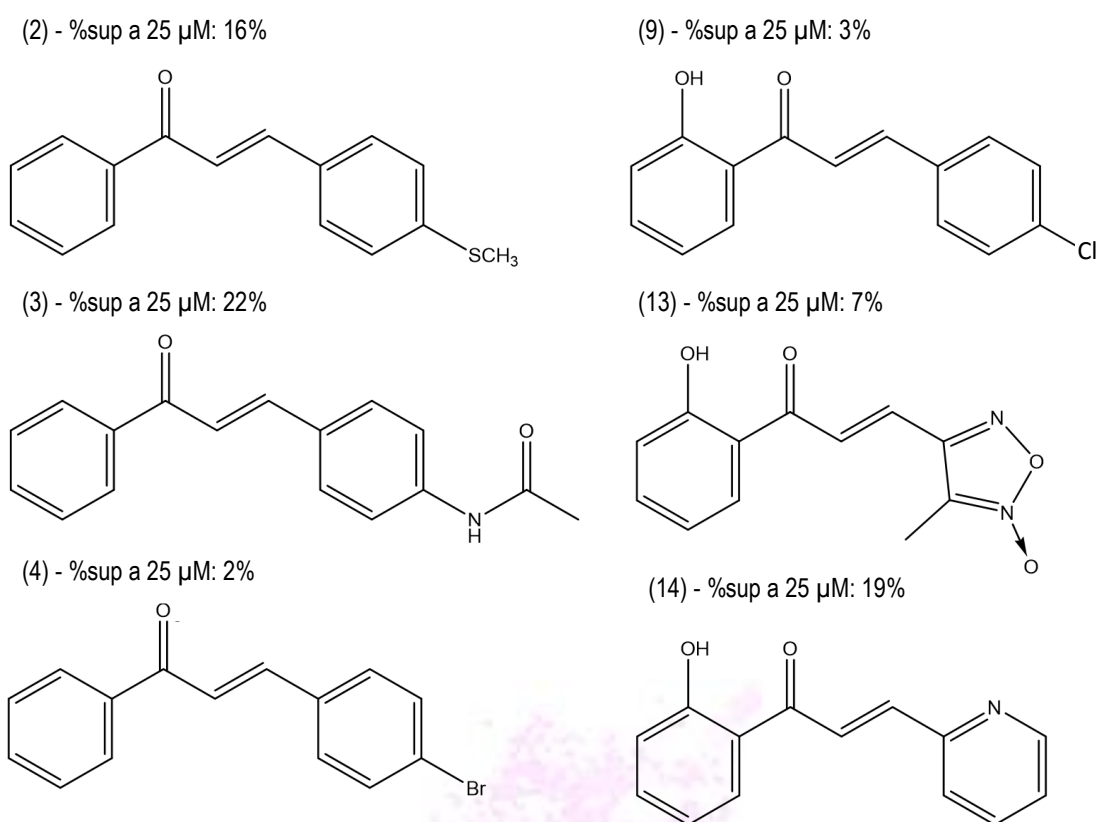


Figura 14. Compuestos con mayor actividad citotóxica a 25 μM .

Si bien no se pueden concluir relaciones estructura-actividad por haber contemplado un número pequeño de estructuras en este trabajo, es posible aún en este caso observar ciertas tendencias cualitativas que deben ser confirmadas o descartadas incluyendo más estructuras en estudios similares. Por ejemplo, comparando las hidroxichalconas **6**, **13** y **14** se ve un efecto positivo en su citotoxicidad al sustituir el anillo B por un heterociclo nitrogenado (ver **figura 14**). Esta mejor actividad al incluir un heterociclo coincide con lo reportado por Cabrera y colaboradores en 2007⁶¹.

Otra observación interesante es que las chalconas no hidroxiladas parecen exhibir una mayor citotoxicidad. Dentro de los compuestos que exhibieron más de un 80% de actividad la gran mayoría son chalconas no hidroxiladas (considerando a las portadoras de heterociclos en una categoría aparte). Esta tendencia se puede evidenciar cuando se compara la actividad de chalconas con sus correspondientes hidroxichalconas, por ejemplo **1** y **7**, **2** y **8**, **4** y **10**. La hidroxichalcona **9** que posee el anillo B *p*-cloro sustituido si bien tuvo una excelente eficacia, no se pudo evaluar por falta de disponibilidad a su análogo no hidroxilado. Sin embargo, es importante destacar que si se evaluó su bioisómero con bromo **10** se y su correspondiente análogo no hidroxilado **4** observándose una mayor actividad para el compuesto no hidroxilado **4**. En el caso de **5** y **14**, no se observa esa tendencia pero esto puede deberse a la influencia de que estos derivados poseen una piridina a modo de anillo B.

Respecto a la influencia del esqueleto del flavonoide respecto a la actividad de los compuestos evaluados, si bien la conclusión no es significativa debido a la evaluación de un solo grupo de cuatro compuestos que solo diferían en su anillo C, el resultado es *a priori* interesante. Los compuestos **15** y **16**, flavanona y flavona (análogas a la chalcona **1** e hidroxichalcona **7**) resultaron ser más citotóxicos, algo que no fue lo observado en descripciones previas de Cabrera *et al.*⁶¹ en donde se había observado que las chalconas eran las más citotóxicas en las familias de flavonoides evaluados (ver **tabla 4**). De repetirse estos resultados probando otras estructuras según este criterio podría explicarse por el hecho de que el mecanismo citotóxico desencadenado en C6, por su particular expresión de receptores y patrones de expresión de otras moléculas posibles blancos, sea distinto al que provocan estos flavonoides en MCF-7, HT-29 y TK-10.

Tabla 4. Comparación de actividad de distintos tipos de flavonoides evaluados en éste trabajo y por Cabrera *et al.*⁶¹.

	(1)	(7)	(15)	(16)
%Sup a 25 μ M				
C6	55 \pm 3	64 \pm 5	40 \pm 2	41 \pm 7
%Sup a 100 μ M				
TK-10	2	0	79	87
MCF-7	19	3	54	57
HT-29	5	14	69	90

Tal como se observa en la **tabla 3**, de las cinco fenazinas evaluadas ninguna mostró actividad citotóxica relevante salvo la fenazina **21**. Este efecto se podría atribuir al sustituyente bromo ya que respecto a la fenazina **20** se observa una marcada diferencia en la actividad. Sin embargo éste efecto no fue observado al analizar el cambio bioisostérico fenol por amina (compuestos **17** y **19**), donde la actividad desplegada por ambos derivados es idéntica considerando la desviación estándar. Nuevamente se hace necesario analizar mayor número de compuestos para sacar conclusiones pero *a priori* el fenol está influyendo en la actividad de alguna manera particular. Puede ser que el agrupamiento fenol favorezca la formación de intermedios quinónicos electrofílicos mediadores de la actividad citotóxica pero más estudios son necesarios para esta afirmación.

Si bien las fenazinas fueron elegidas por sus prometedores resultados *in vivo*, al ser evaluados en éste sistema no fueron compuestos de gran relevancia biológica, esto probablemente se debe a que las mismas fueron evaluadas en condiciones de normoxia, las fenazinas en general exhiben su mayor potencial citotóxico en células hipóxicas, dado a que su ambiente reductor permite la reducción del agrupamiento *N*-óxido liberando radicales hidroxilo. Esto reafirma el hecho de que el principal mecanismo de acción de estos compuestos es mediante el daño celular por la producción de radicales libres, pudiendo el compuesto **21** tener acción tóxica por otro mecanismo en éste sistema. Este dato relevante debe de ser tenido en cuenta si se decide evaluar estas fenazinas en modelos de gliomas *in vivo*. Si bien los datos observados *in vitro* sobre C6 no fueron prometedores (probablemente porque no se consideró la hipoxia) en los modelos *in vivo* pueden cambiar considerando el microambiente tumoral y la actividad *in vivo* mostrada sobre otros modelos.

CITOTOXICIDAD EVALUADA A DOSIS - RESPUESTA

Las chalconas que demostraron ser más citotóxicas a dosis fija fueron evaluadas a concentraciones de 20, 15, 10, 5 y 1 μM con el fin de determinar los perfiles dosis respuesta (grafico % supervivencia vs. concentración, **figura 15**). Interpolando en dicho gráfico es posible obtener el IC_{50} , dosis a la cual se observa un 50% de mortalidad celular, parámetro que es importante para evaluar la efectividad de un compuesto.

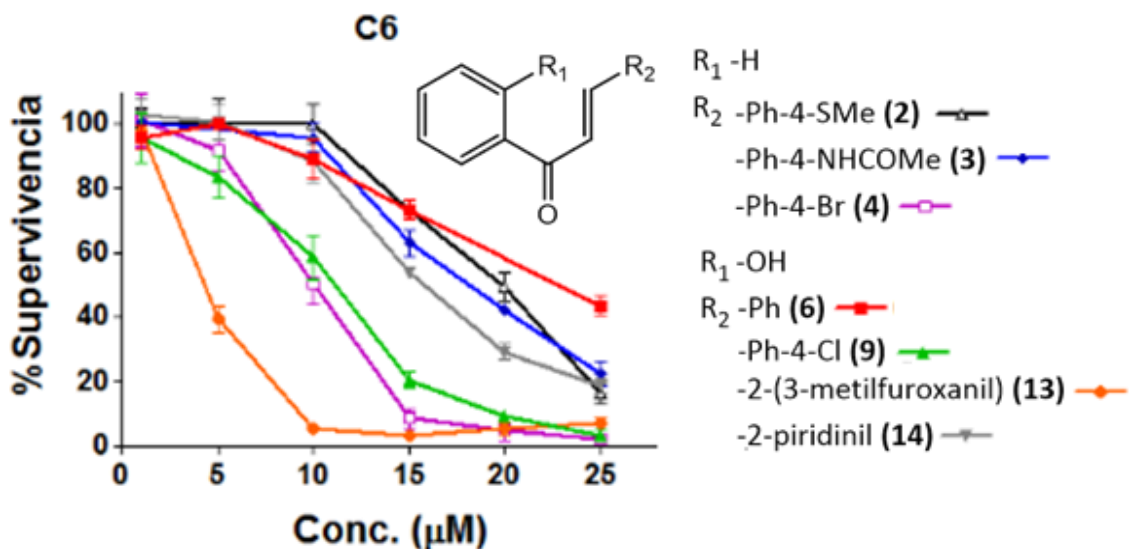


Figura 15. Perfiles dosis-respuesta en C6 de los compuestos evaluados.

Los perfiles dosis-respuesta de la mayoría de los compuestos son similares, observándose una respuesta sigmoidal característica de muchas respuestas farmacológicas. Dentro de esos compuestos distinguimos a un grupo formado por **2**, **3**, **6** y **14** y otro grupo que integran **4** y **9**, siendo los segundos más citotóxicos tal como lo indican sus curvas en donde a cada concentración se aprecian menores porcentajes de supervivencia. Éstos tienen la particularidad de portar un sustituyente halógeno en el anillo B, viendo la importancia del mismo, aún en distintos esqueletos carbonados de familias distintas de flavonoides (chalcona e hidroxichalcona). Debido a que se observa la tendencia de que las chalconas no hidroxiladas son más citotóxicas que sus análogas portadoras de un fenol en el anillo A, sería interesante evaluar una chalcona no hidroxilada que tenga un sustituyente cloro en B, de seguir la tendencia es plausible esperar alta citotoxicidad frente a C6, incluso mayor que la exhibida por el compuesto **4** (cuyo análogo hidroxilado no mostró actividad remarcable, aspecto que el derivado hidroxilado portador de cloro sí mostró), pudiendo entonces concluir que la disminución del volumen del sustituyente podría estar jugando un rol importante en la actividad de estas chalconas halogenadas.

En estos estudios además se incluyó el compuesto **6** debido a que el IC_{50} se determinó en las tres líneas del NCI así como para la línea HK-2 derivada de células de riñón humanas no tumorales. Fue posible determinar los IC_{50} para los siete compuestos de interés tal como se observa en la **tabla 5**.

Tabla 5. IC₅₀ sobre varias líneas tumorales de las chalconas más citotóxicas.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)				
	C6	TK-10	MCF-7	HT-29	HK-2
2	20 ± 3	-	-	-	-
3	19 ± 3	-	-	-	-
4	10.0 ± 0.1	-	-	-	-
6	22.8 ± 0.8	79.0	78.0	85.0	24.4
9	11 ± 2	-	-	45.0	-
13	5 ± 1	-	-	-	-
14	16 ± 3	12.2	6.7	13.8	7.9

Si bien según se muestra en la **tabla 5** para estos compuestos en particular la mayoría de los IC₅₀ no están determinados, en el trabajo de Cabrera *et al.*⁶¹ se puede ver que los valores de dicho parámetro para la serie de chalconas evaluadas en MCF-7, TK-10, HT-29 y HK-2 están por sobre los 40 μM en la gran mayoría de los casos (salvo excepciones, como el compuesto **14** que demostró tener una actividad citotóxica similar en todas las líneas celulares evaluadas), se puede decir entonces que los valores de IC₅₀ muestran que los compuestos evaluados son particularmente eficaces en la línea tumoral glial.

En el caso del compuesto **6** se observó algo interesante, dado que su IC₅₀ es prácticamente el mismo en C6 que en la línea no tumoral HK-2, cosa que no se observa cuando se compara con las líneas tumorales humanas, esto podría ser indicativo de que en C6 el mecanismo citotóxico de esta chalcona presumiblemente sea el mismo que opera en HK-2. Por otro lado, este hecho destaca la importancia de que diferentes fenotipos celulares se asocian a diferentes perfiles de citotoxicidad y esto a su vez se asocia con diferencias biológicas a nivel de expresión de receptores, en las tasas de proliferación y expresión de posibles blancos moleculares, que podría haber entre C6, HK-2 y las líneas tumorales humanas MCF-7, HT-29 y TK-10.

Cabe resaltar el comportamiento particular del compuesto **13**, tal como se observa en la **figura 15**, hay un descenso abrupto, observándose alta toxicidad a bajas concentraciones (se ve reflejado esto en su valor de IC₅₀, ver **tabla 5**), para finalmente a concentraciones más allá de los 20 μM empezar a exhibir menos toxicidad.

DETERMINACIÓN DE SELECTIVIDAD

A pesar de que se obtuvieron valores de IC_{50} bajos para C6, es importante determinar si la acción citotóxica de los compuestos de interés es selectiva para las células tumorales, dado a que en un potencial fármaco antitumoral se desea afectar lo menos posibles a las células sanas. Por eso para determinar el índice de selectividad de los compuestos se procedió a determinar los IC_{50} de los mismos en astrocitos, células mayoritarias de sistema nervioso central y que son, junto con sus precursores, las que pueden dar origen a astrocitomas y glioblastomas (que corresponden a más de un 70% de los gliomas). El índice de selectividad se calcula como el cociente entre el IC_{50} en astrocitos (obtenidos a partir de los perfiles dosis respuesta) y el IC_{50} en C6, dando una idea de en qué proporción afecta a las células tumorales respecto a los astrocitos obtenidos a partir de un cultivo primario de corteza cerebral.

Para obtener la curva dosis-respuesta (**figura 16**) se evaluó el porcentaje de supervivencia de astrocitos primarios tras el tratamiento por 24 horas con el compuesto de interés. Se probaron varias concentraciones que abarcan desde 100 μM a 1 μM , ampliándose el rango respecto a C6 partiendo de la hipótesis de que los compuestos iban a tener cierta selectividad, siendo su IC_{50} mayor por lo menos a 25 μM .

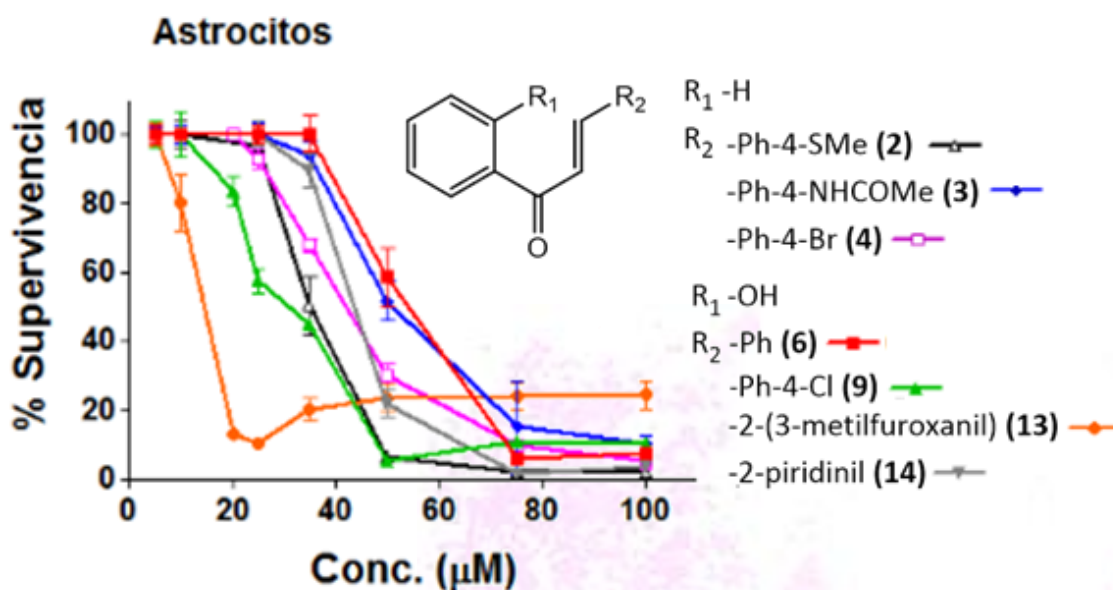


Figura 16. Perfiles dosis-respuesta en astrocitos de los compuestos evaluados.

Nótese el comportamiento de los compuestos 2 y 4, en el primero de los casos la curva dosis-respuesta se desplaza a la izquierda respecto a la mayoría de los compuestos, esto indica que es más tóxico para los astrocitos respecto a los otros compuestos que en C6 tuvieron un IC_{50} similar. Respecto al compuesto 4, su curva claramente se desplaza hacia la derecha, lo que indica una mayor selectividad que el compuesto 9, también sustituido por un halógeno, pero siendo una hidroxichalcona en este caso. Nuevamente sería

interesante ver qué pasa con el análogo no hidroxilado de **9**, para ver si la selectividad de los flavonoides halogenados tiene que ver con la ausencia de un anillo fenólico en A.

Al trabajar con concentraciones más altas se acentúa el comportamiento dosis respuesta diferencial de **13**, que no sólo muestra menos toxicidad a dosis más altas, sino que luego alcanza una meseta en la que se deja de observar una dependencia de la actividad del compuesto y su dosis. Esto posiblemente se deba a que ésta chalcona actúe por un mecanismo citotóxico diferente de las otras, cosa que resulta convincente si observamos las estructuras de los otros compuestos, que representan una serie bastante homogénea, destacándose **13** por presentar un heterociclo *N*-oxidado en el anillo B, pudiéndose relacionar esto con su comportamiento particular, mecanismo citotóxico y alta toxicidad para ambas líneas (se observan IC₅₀ bajos tanto en C6 como en astrocitos, ver **tabla 6**).

Tabla 6. IC₅₀ en C6 y astrocitos primarios. Se expresa el índice de selectividad (IS) para cada compuesto como el cociente entre esas magnitudes.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)		Índice de Selectividad (IS)
	C6	Astrocitos	
2	20 ± 3	37 ± 4	2
3	19 ± 3	55 ± 3	3
4	10.0 ± 0.1	42 ± 3	4
6	22.8 ± 0.8	60 ± 4	2
9	11 ± 2	31 ± 4	3
13	5 ± 1	14 ± 3	3
14	16 ± 3	48 ± 5	3

Tal como se observa en la **tabla 6** todos los compuestos demostraron cierta selectividad frente a la línea tumoral, sin embargo se destaca la acción de los compuestos **3, 9, 13, 14** y sobretodo del compuesto **4** (**figura 17**), tal como fue previsto simplemente analizando su curva dosis-respuesta, que demostró ser cuatro veces más efectivo en células tumorales, mostrando acción citotóxica entre los 5 y 15 μM donde, tal como lo indica su perfil dosis-respuesta, no exhibe citotoxicidad en astrocitos primarios.

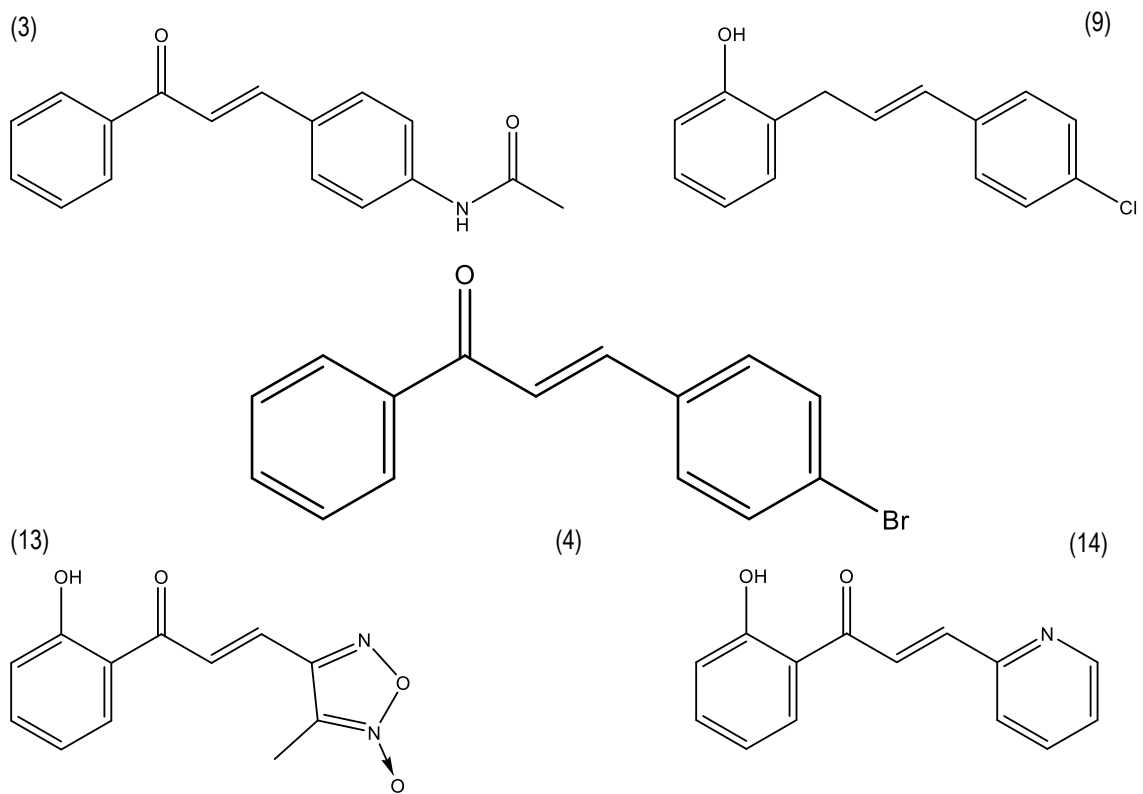


Figura 17. Compuestos con mayor grado de selectividad frente a C6

Los parámetros hallados nos permiten tener idea de las concentraciones en la que utilizar los compuestos de modo que garanticen la eficacia del fármaco y eviten la toxicidad del mismo. Se puede definir para cada compuesto una ventana terapéutica, que corresponde a la amplitud de concentraciones dentro de las cuales existe una elevada probabilidad de obtener la respuesta clínica deseada con una baja probabilidad de efectos tóxicos. En la **figura 18** se puede apreciar la ventana terapéutica del compuesto **4**, nótese como debido a la selectividad del compuesto la ventana abarca un amplio rango de concentraciones en donde es 100% tóxico para las células tumorales sin tener efectos tóxicos significantes en astrocitos.

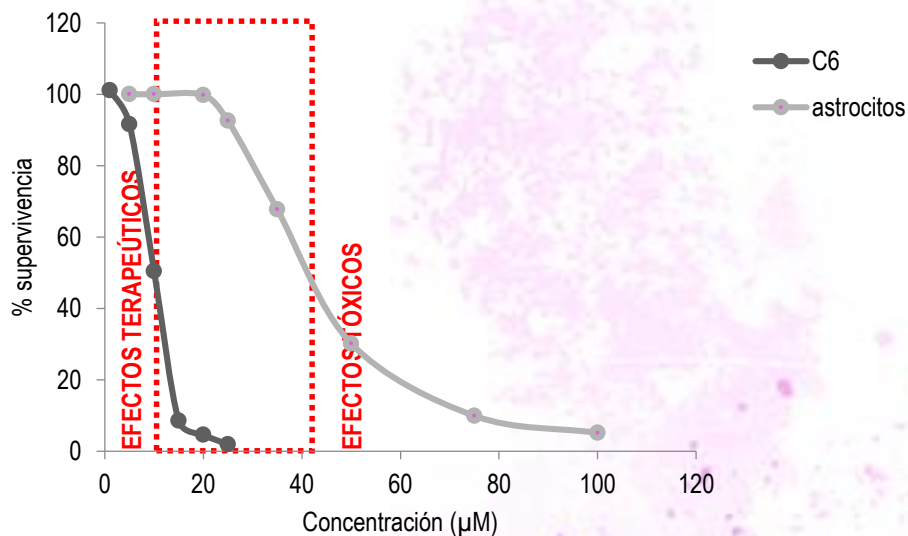


Figura 18. Ventana terapéutica para el compuesto **4**.

APROXIMACIONES *IN VIVO*

INCURSIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE INDUCCIÓN DE GLIOMA

Se propone en este trabajo realizar una primera aproximación a un modelo animal de tumorigénesis glial por inducción química con MNU. Basándonos en el modelo de Druckrey y colaboradores⁴⁸ se propone aprovechar no sólo las ventajas que ofrece la carcinogénesis química sino la característica de éste modelo de exponer a los animales al agente carcinógeno en un período final de diferenciación de un tejido que además de por si tiene mecanismos de reparación deficientes en lo que concierne a la principal modificación introducida por el MNU (O⁶-metilación de la Guanina), lo que permite que tras una única administración se induzca efectivamente la aparición de neoplasias gliales.

Con el fin de abstenerse del hecho de administrarle el carcinógeno a una hembra a final de su gestación para exponer a los fetos al mismo por vía transplacentaria, se pretende inyectar directamente una solución de MNU en neonatos P1. En este período de la vida de los neonatos la diferenciación de la glía aún no ha finalizado y se observan altas tasas de proliferación glial, lo que implica que su SNC aún está vulnerable frente a la exposición de un carcinógeno. La inyección se realizará en la *cisterna magna* (o *cisterna cerebellomedullaris*), una de las principales aberturas en el espacio subaracnoideo, dado a que es fácil de localizar y que posibilita el contacto directo con todo el SNC vía líquido cefalorraquídeo. Este hecho brinda la posibilidad de reducir la cantidad de MNU usado dado a que no se administra por vía sistémica en la madre, teniendo que ponerse en contacto con todo el organismo de la madre para luego pasar por vía transplacentaria a todas las crías. Las modificaciones a realizar al modelo de Druckrey pretenden facilitar la manipulación animal y minimizar las cantidades de carcinógeno usado, pero imponen el desafío de determinar la concentración de carcinógeno a usar y la latencia de los tumores inducidos, en el caso de tener éxito en la inducción.

El esquema de trabajo a seguir se muestra en la **figura 12** en la sección materiales y métodos. Para una primera aproximación se inyectará una solución de MNU de manera de lograr en el LCR una concentración final de 150µM. Se esperará 4 meses antes de procesar los animales para análisis histológico, debido a que es la latencia reportada para varios trabajos en los que se seguía el protocolo de Druckrey y colaboradores ^{48,49,50}.

Una vez fijado el tejido se procedió a hacer cortes seriados a vibrátomo de 50µm de espesor, los mismos fueron teñidos con DAPI y analizados por microscopía láser confocal e interferencial de Nomarski.

Mediante a la posibilidad del DAPI de interactuar con el ADN es posible visualizar la posición de los núcleos en las láminas obtenidas a partir de los animales expuestos a NMU y los animales control, analizando y localizando las estructuras del sistema nervioso es posible la detección de anomalías histoarquitectónicas que podrían indicar la presencia de un tumor (ver **figura 19**), dentro de éstas anomalías podría llegar a verse acumulación de núcleos así como núcleos pleomórficos, amplia actividad mitótica, alteración morfológica de alguna región, pérdida de simetría entre estructuras de distintos hemisferios y defectos en la mielinización.

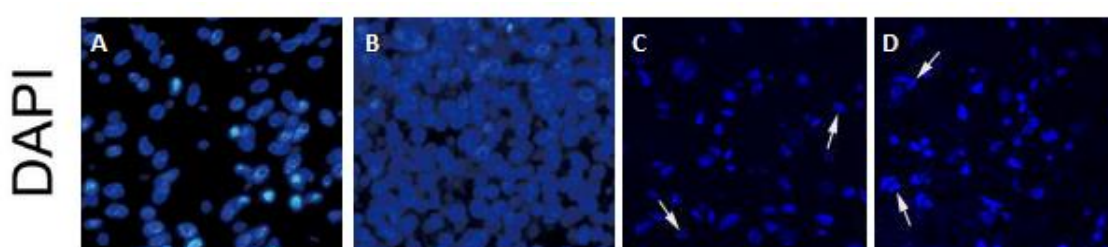
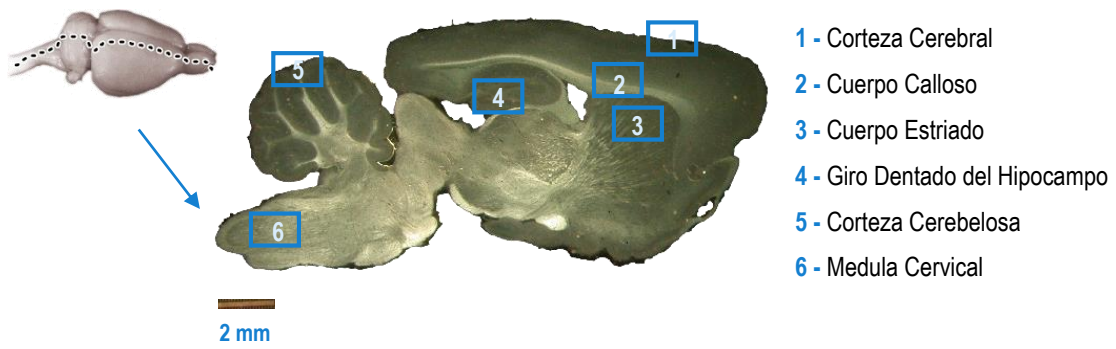


Figura 19. Ejemplos de anomalías visualizadas por DAPI en muestras de tejido extraídas de glioma. A es tejido de tallo cerebral normal. En B se ve el aumento de la cantidad de núcleos que se ve en el tallo cerebral de un paciente con glioma. En C y D se observan muestras de un GBM, en flechas se señalan núcleos pleomórficos y mitosis evidenciadas por la tinción con DAPI. Adaptada de ^{72,73}

En las siguientes figuras se representarán cortes representativos de los animales tratados de las series de cortes coronales (que se hicieron para los animales 2, 3 y 4) para lo que se eligen *slices* que corresponden a cerebro anterior y *slices* de una zona más posterior (**figura 21**). A su vez se analizaron todas las láminas correspondientes a cortes parasagittales que se hicieron en el cerebro del animal 1, eligiéndose mostrar imágenes representativas de los mismos tal como se muestra en la **figura 20**. Los cortes fueron analizados primero a bajo aumento, buscando densidades nucleares altas que pudieran indicar la formación de una neoplasia. Posteriormente se recorrieron estructuras conocidas con el fin de buscar anomalías morfológicas, infiltración de matriz, núcleos en distintos estadios de mitosis, entre otras características propias de un tejido tumoral. Dicho procedimiento se realizó para un corte de cada una de las series tanto para los animales tratados como para los animales control.

⁷² Wang X, Zhang H, Zhang A, Han L, Wang K, Liu R, Yang S, Pu P, Shen C, Kang C, Yu C. *Upregulation of miR-20a and miR-106b is involved in the acquisition of malignancy of pediatric brainstem gliomas.* Oncol Rep. 2012; 28(4):1293-300.

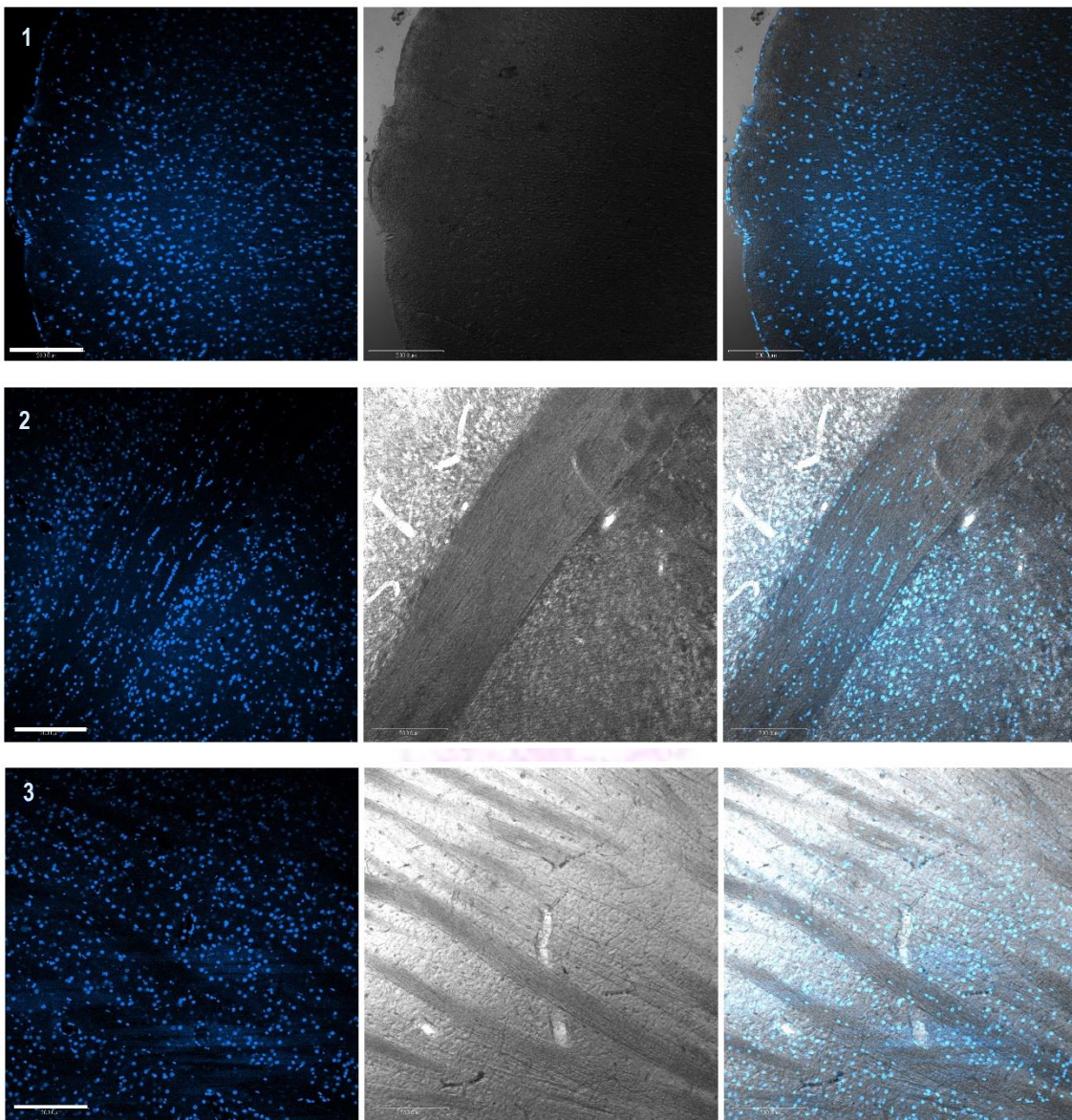
⁷³ Siva K, Venu P, Mahadevan A, S K S, Inamdar MS. *Human BCAS3 expression in embryonic stem cells and vascular precursors suggests a role in human embryogenesis and tumor angiogenesis.* PLoS One. 2007; 2(11):e1202.



DAPI

NOMARSKI

DAPI/NOMARSKI



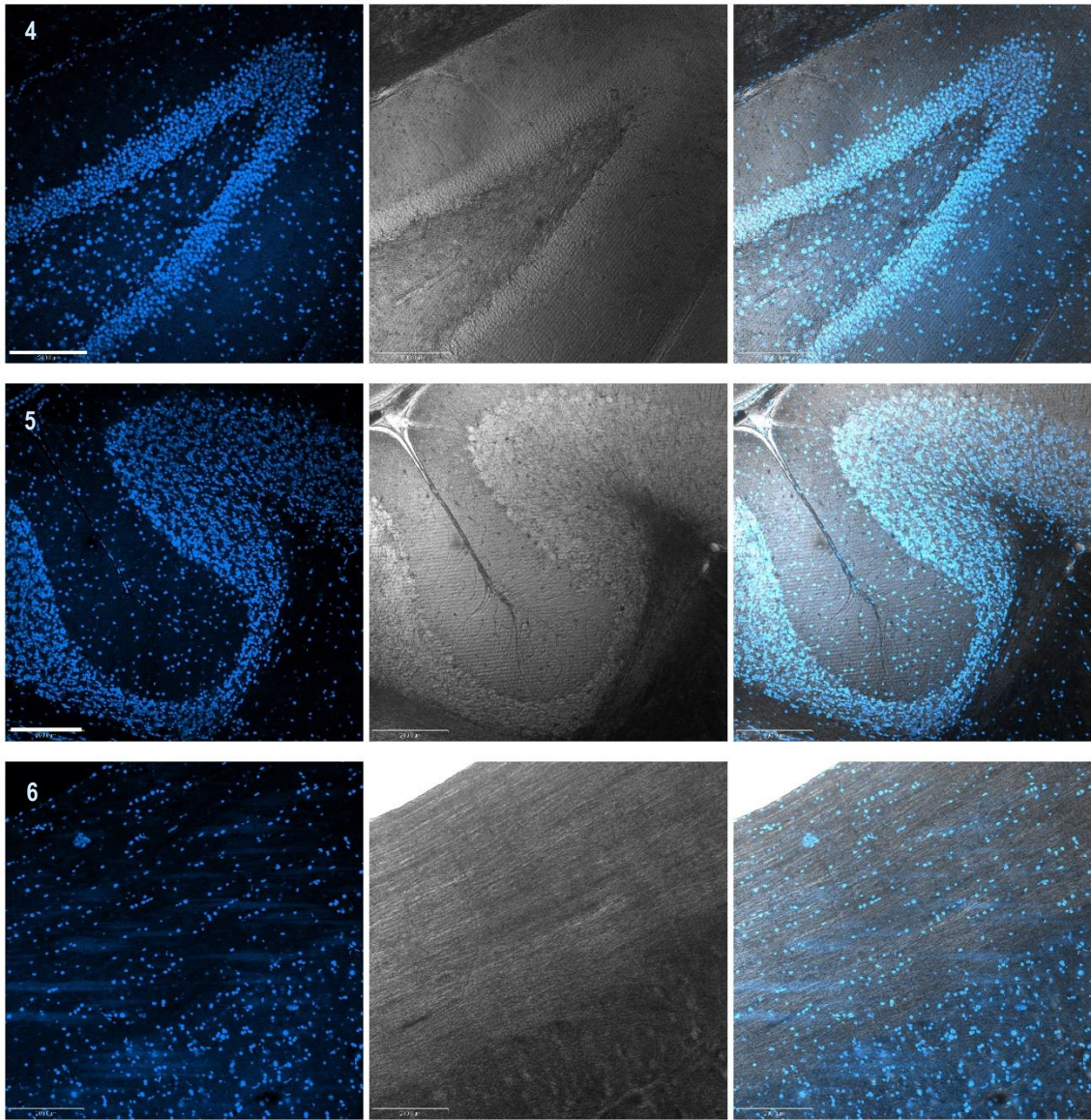
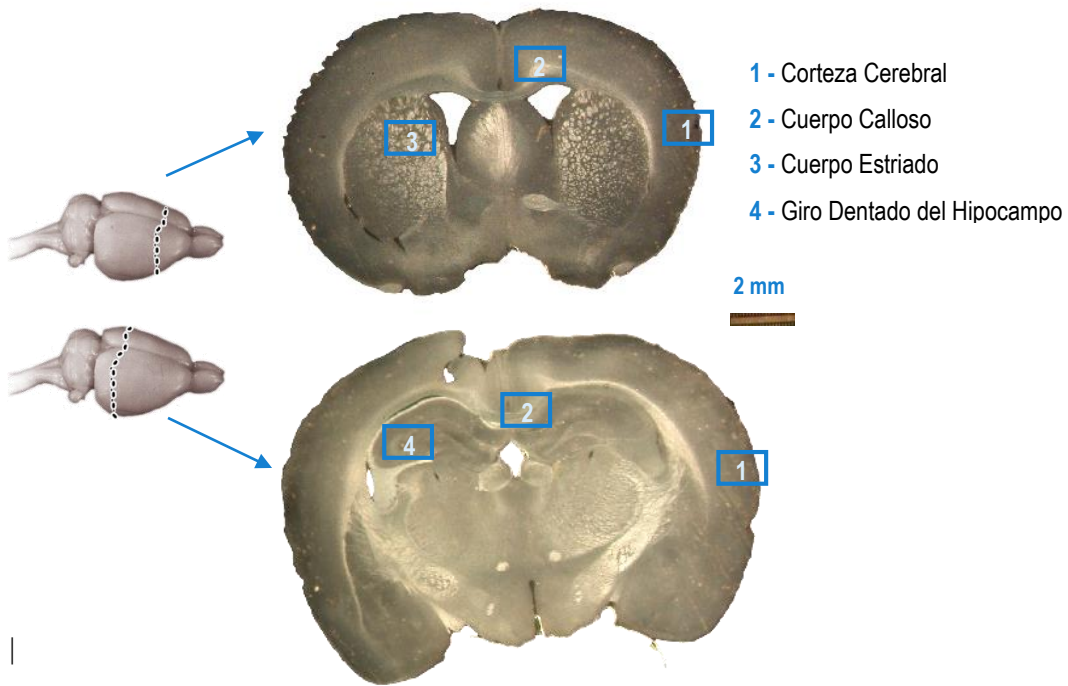


Figura 20. Cortes parasagitales. Se representan varias estructuras que se ven normales respecto al control. Obsérvese la falta de acúmulos nucleares, presentando en todas las imágenes una densidad nuclear esperada de acuerdo a la región que se está analizando. No se observan a su vez anomalías en las zonas de sustancia blanca (visualizándose como zonas compactas y oscuras formadas por haces paralelos en Nomarski) lo que indica una mielinización normal. *Barra de calibración: 200 μ m*

Respecto a los controles no se observa ninguna diferencia, las imágenes mostradas en la **figura 19** no presentan anomalías estructurales respecto a la corteza cerebral y cerebelosa de los animales control, tampoco en el cuerpo calloso, hipocampo, cuerpo estriado o médula cervical.

En la siguiente figura se muestran cortes representativos de los animales 2, 3 y 4, cuyos cerebros luego de fijados y disecados fueron cortados coronalmente. Se distinguen estructuras anteriores y posteriores.

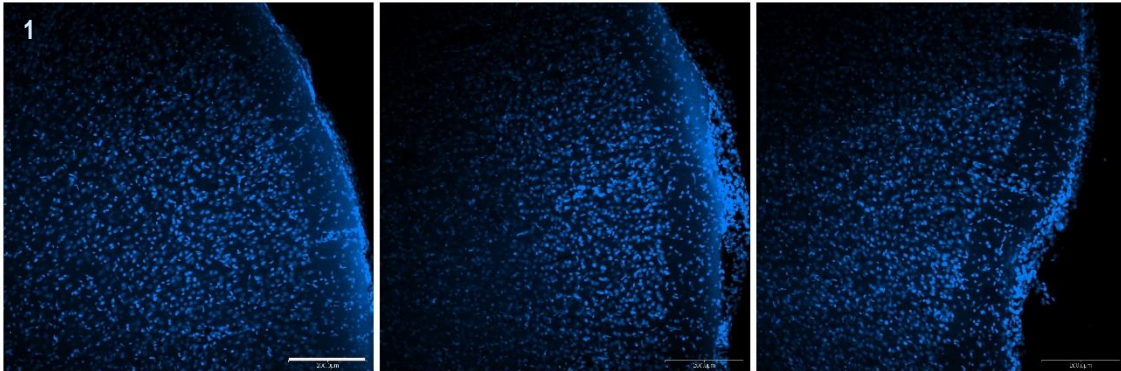


ANIMAL 2

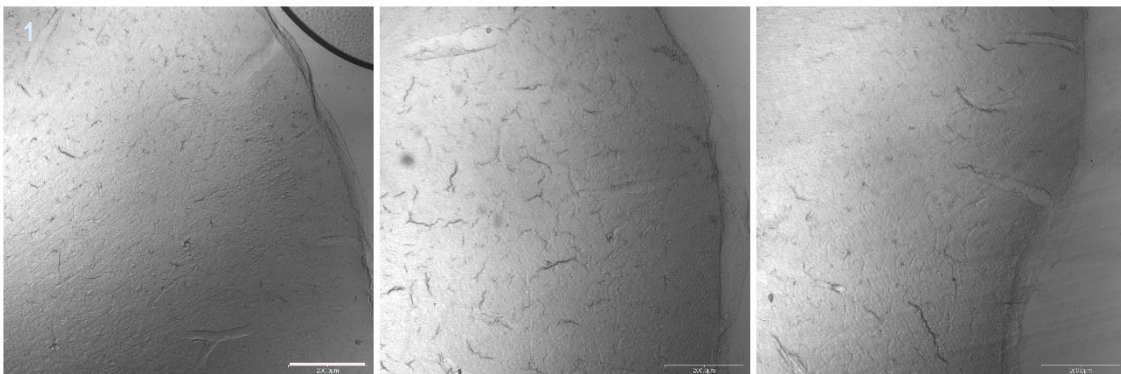
ANIMAL 3

ANIMAL 4

DAPI



NOMARSKI

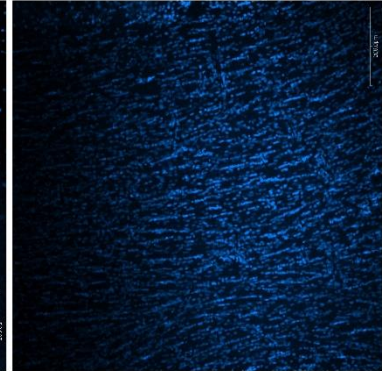
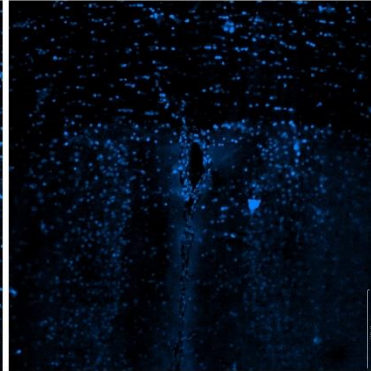
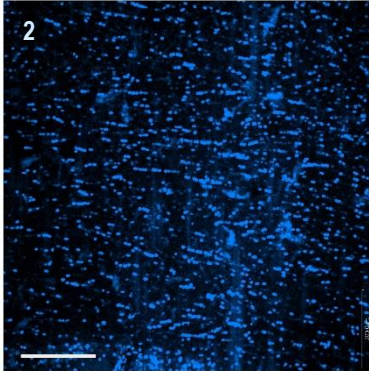


ANIMAL 2

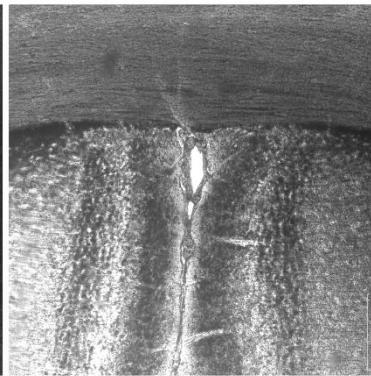
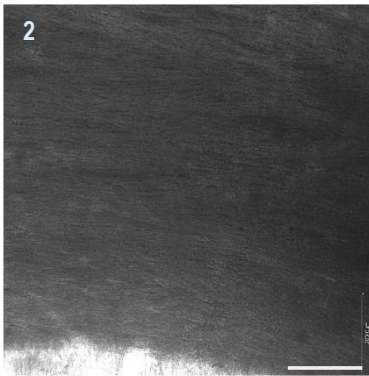
ANIMAL 3

ANIMAL 4

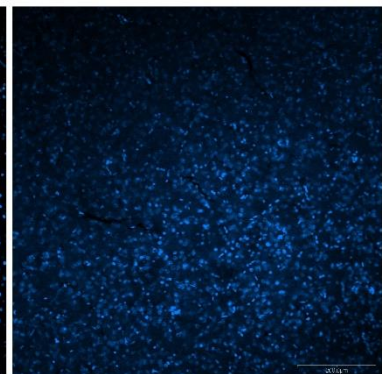
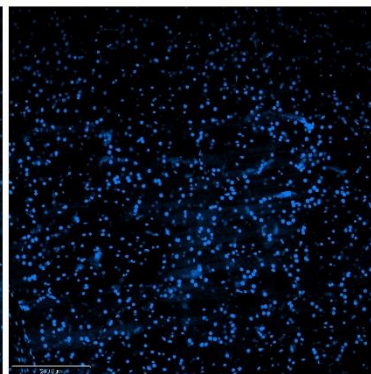
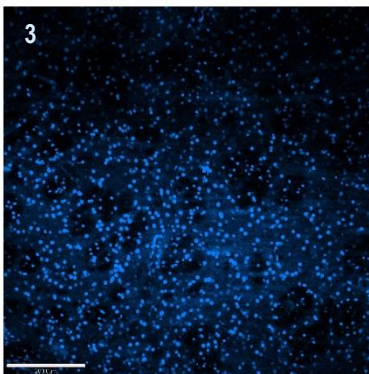
DAPI



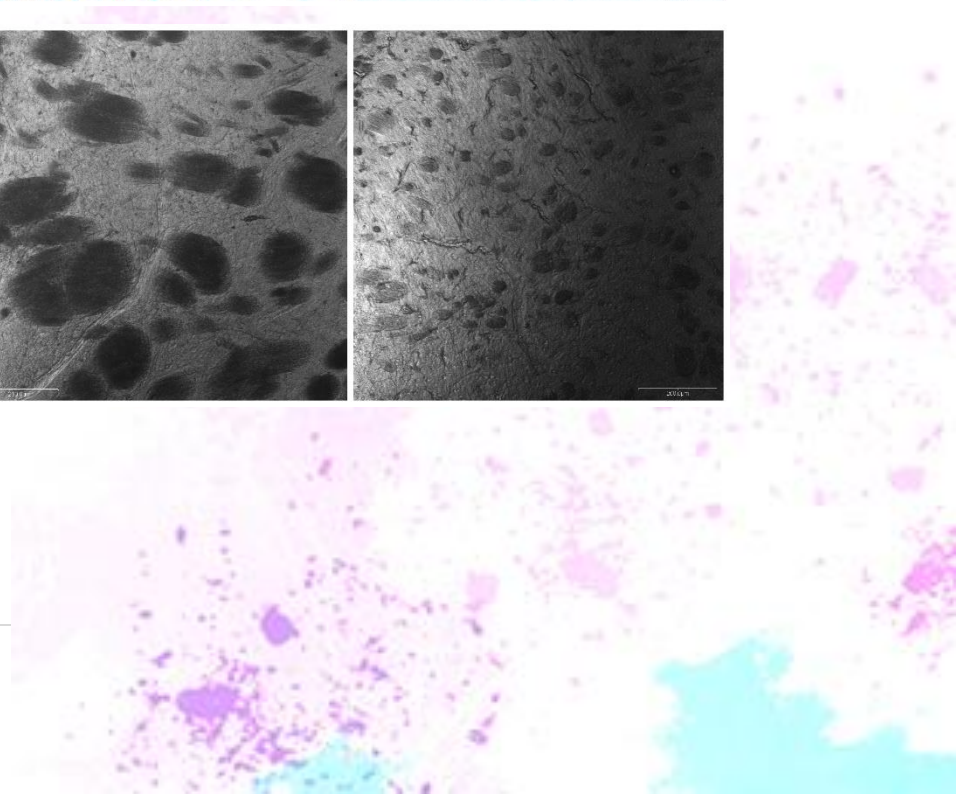
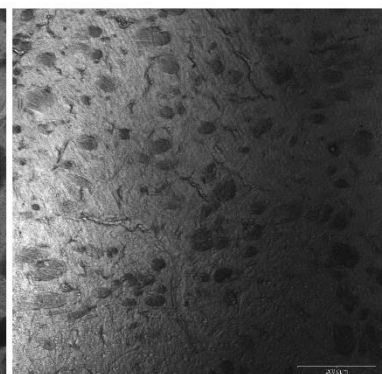
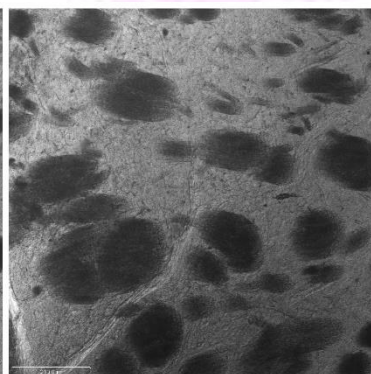
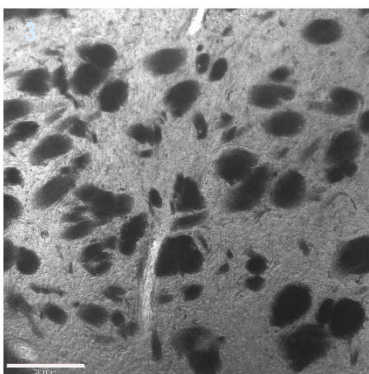
NOMARSKI



DAPI



NOMARSKI



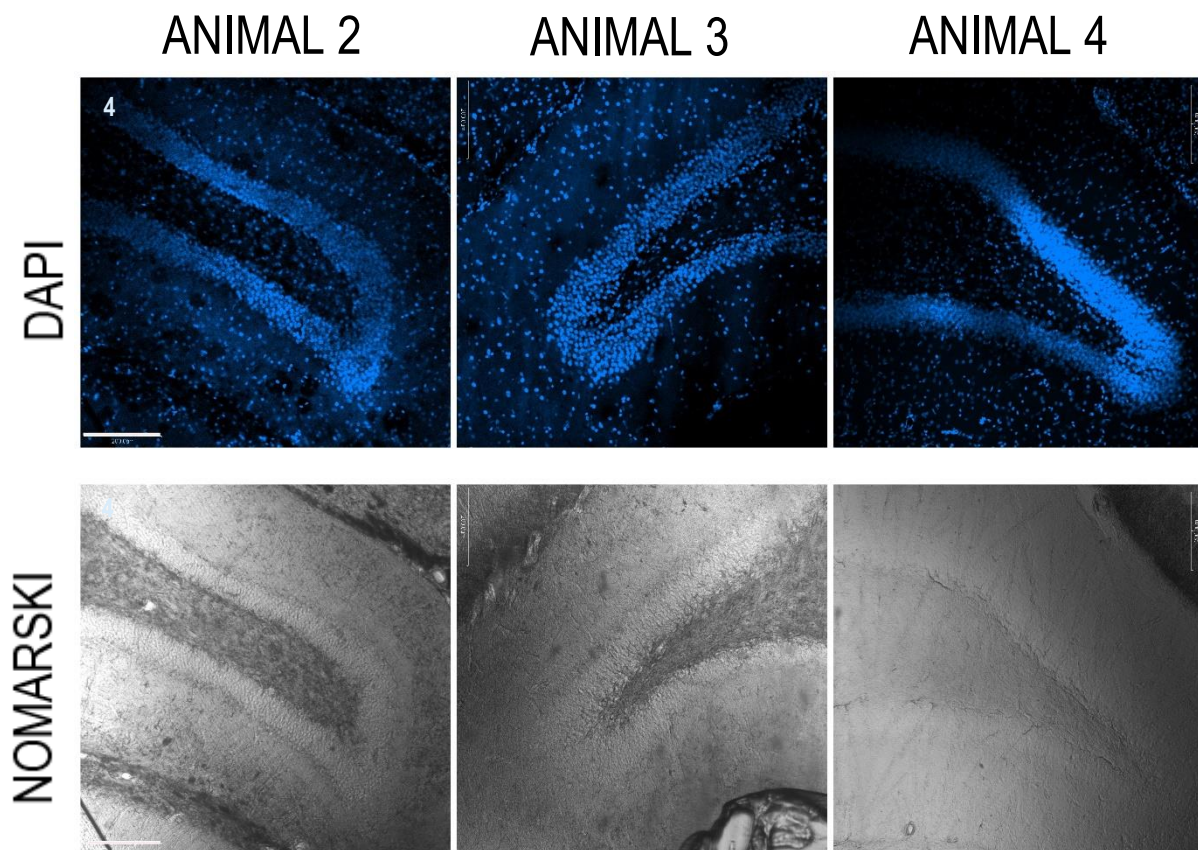


Figura 21. Cortes coronales. No se observan acúmulos nucleares ni anomalías en sustancia blanca. Llama la atención en el animal 4 el escaso grosor de los haces de axones mielinizados del estriado. *Barra de calibración: 200 μ m*

Al analizar los distintos cortes correspondientes a los 4 animales tratados así como a los controles inyectados con vehículo (PBS) la única anomalía encontrada fue una hipomielinización en el estriado del animal 4 tratado con MNU tal como se observa en la **figura 21**. El diámetros disminuido de los haces y una coloración más clara es evidencia de una anomalía en la mielinización, ofreciendo el estriado de este animal una apariencia semejante a la de un animal mucho más joven (14 días). Sin embargo, debido a que en ningún corte se ve ninguna alteración en la densidad de los núcleos de oligodendrocitos ni actividad mitótica elevada así como la falta de infiltración de matriz en los haces, no hay evidencia con las herramientas que se están utilizando que esta hipomielinización sea debido a la presencia de un tumor derivado de oligodendrocitos o sus precursores, el análisis de pequeñas diferencias que se ven incluso en los animales tratados y que podría estar relacionado con una acción de MNU (distinta a la inducción de neoplasias gliales) escapa a los objetivos de ésta tesina . No se incluyen, debido a que no se observan evidencias de neoplasmas, figuras correspondientes a los controles, en donde en todos los casos se observaron formaciones similares a las ilustradas en las **figuras 20 y 21**.

El análisis con las herramientas utilizadas del material tisular obtenido a partir de las ratas de 4 meses tratadas con 150 μM de MNU en el día 1 post-nacimiento y su comparación con los controles, indica que no hay ninguna formación sospechosa que pueda corresponderse con la aparición de un glioma inducido químicamente. Este hecho puede estar relacionado con varios factores que necesariamente deben determinarse a la hora de proponer una nueva metodología en base a un modelo ya establecido, como por ejemplo la optimización de la dosis de MNU a suministrar. Una posibilidad es que la dosis a la que fueron expuestos los neonatos no haya sido suficiente para desencadenar los suficientes eventos mutagénicos que conduzcan posteriormente a una neoplasia. Otra posibilidad es que el tiempo al que los animales fueron sacrificados no fue suficiente como para observar la presencia de una neoplasia, aunque 120 días era suficiente para tener un tumor de tamaño considerable en el modelo original donde la exposición al MNU era por vía transplacentaria, con las modificaciones realizadas puede ser que la latencia de los tumores inducidos sea mayor. Un aspecto también a mejorar podría ser la solución en la cual se disuelve el MNU (vehículo), cambiar a una solución levemente ácida como ser un buffer fosfato disódico y ácido cítrico (pH=6,0) ayudaría a mantener la estabilidad del MNU y podría tener un efecto positivo en la inducción. Finalmente en este modelo podría ser necesaria la utilización de un promotor del desarrollo tumoral en etapas posteriores a la administración de MNU cuando el animal es adulto.

De haberse observado una formación sospechosa de ser tumoral en los animales tratados evidenciados por la tinción con DAPI se procedería a hacer un análisis inmunohistoquímico más fino en las láminas de la serie (o las series) en donde se haya visualizado el tumor, buscando marcadores de proliferación como ser Ki-67 (proteína estrictamente asociada a la proliferación celular y que tiene que ver con la transcripción de ARN ribosomal) y marcadores de extirpe celular. Los marcadores astrocitarios GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y S100 β (proteína de unión a calcio) serían útiles para evidenciar la aparición de un astrocitoma, pudiendo incluso ver la relación entre la expresión del tumor de esos marcadores, lo que daría una idea del grado de diferenciación del mismo, esperando una menor expresión de S100 β en un astrocitoma anaplásico con relación a la GFAP. Marcadores de oligodendrocitos como Olig1 y Olig2 (factores de transcripción involucrados en la diferenciación de oligodendrocitos) podrían evidenciar que la acumulación nuclear observada con DAPI corresponde a un oligodendroglioma, posiblemente de bajo grado ya que éstos son marcadores de oligos maduros. El marcador NG2 (proteoglicano de superficie) para precursores de oligos podría ser de utilidad, pudiendo dar información valiosa junto con MAG (glicoproteína asociada a mielina), esperando ver en un oligodendroglioma anaplásico proliferación de precursores NG2 lo que conlleva a comprometer la mielinización, bajando la relación MAG/NG2. En síntesis, de observar algo interesante en un análisis morfológico con DAPI, lo siguiente sería proceder con un análisis inmunohistoquímico que nos brindaría información interesante para realizar un diagnóstico primario, a confirmar luego con un anatomopatólogo.



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se identificaron cinco chalconas con acción citotóxica selectiva frente a una línea tumoral glial.

Fueron seleccionados a partir de una quimioteca propia 21 compuestos pertenecientes a la familia de los flavonoides y los *N,N'*-dióxidos de fenazina. Fue posible realizar un método de tamizaje efectivo para identificar a los compuestos más citotóxicos en la línea C6 derivada de astrocitoma de rata. Se determinó el perfil dosis-respuesta para esos compuestos y sus correspondientes IC₅₀ tanto en la línea tumoral como en astrocitos primarios, pudiendo ser posible con esos parámetros determinar el índice de selectividad de los compuestos. Si bien los errores fueron bastante significativos en la mayoría de los casos (indicando que es necesario realizar más experimentos para disminuir la dispersión de datos) se distingue un comportamiento claramente selectivo en cinco de las chalconas seleccionadas, que además ejercen su acción citotóxica en las células tumorales a una dosis cuatro veces más baja que la dosis de partida del NCI para la búsqueda de nuevos agentes antitumorales.

Con el fin de realizar un análisis químico médico más profundo y determinar relaciones estructura-actividad relevantes se propone realizar los mismos ensayos incluyendo nuevas estructuras.

El compuesto **4** demostró ser el compuesto más prometedor, siendo especialmente el más selectivo y mostrando una acción citotóxica potente en la línea C6 frente a la cual exhibe un IC₅₀ de 10.0 (± 0.1) μM, teniendo su acción antitumoral además en un intervalo en donde no se vieron efectos tóxicos en los cultivos de astrocitos (ver **figura 18**). Tanto para éste compuesto, como para los que demostraron ser selectivos, se pretende realizar estudios de solubilidad, pasaje de barrera hematoencefálica y otras propiedades relevantes, así como hacer ensayos de toxicidad.

La inyección de 150 μM de MNU en la *cisterna magna* no logró inducir la aparición de gliomas en cuatro meses.

No fue posible detectar con las herramientas utilizadas la aparición de neoplasias gliales en el cerebro de los animales inyectados con MNU. Dado a la necesidad de contar con un modelo animal de relevancia clínica para el estudio de nuevas estrategias de terapia y diagnóstico y de las ventajas que tiene éste modelo de carcinogénesis química se pretende seguir refinando varios aspectos. Continuando en ésta línea de trabajo ya fueron inyectados 13 animales con una dosis mucho mayor de 750 μM, similar a las concentraciones que demostraron transformar cultivos de células epiteliales tras una breve exposición^{74,75}. Gracias a que el n es mayor se podrá procesar animales a distintos tiempos, contemplando varios períodos

⁷⁴ Rhim JS, Jin S, Jung M, Thraves PJ, Kuettel MR, Webber MM, Hukku B. *Malignant transformation of human prostate epithelial cells by N-nitroso-N-methylurea*. Cancer Res. 1997; 57(4):576-80.

⁷⁵ Miyamoto S, Guzman RC, Osborn RC, Nandi S. *Neoplastic transformation of mouse mammary epithelial cells by in vitro exposure to N-methyl-N-nitrosourea*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85(2): 477-481.

de latencia además de optimizar la dosis. Otra alternativa sería seguir un protocolo similar en un siguiente nacimiento inyectando MNU en una solución ácida. Finalmente, debido al papel que juega la inmunidad en el desarrollo de tumores y a la posible necesidad de suministrar un promotor para el desarrollo del tumor, se maneja la posibilidad de inyectar lipopolisacárido (LPS) en la cisterna magna de animales adultos, con el fin de lograr una respuesta inmune en el SNC que favorezca la progresión del neoplasma en el caso de haber células ya transformadas^{76,77}.

Las perspectivas de este trabajo es contar con un modelo de glioma *in vivo*, luego proceder con la caracterización del mismo mediante análisis histológico e inmunohistoquímico, utilizando marcadores discutidos anteriormente. Éste modelo pretende ser de utilidad para probar la eficacia *in vivo* de los compuestos que demostraron actividad interesante *in vitro* en este trabajo, a su vez se pretende seguir la evolución de estos tumores así como los efectos terapéuticos de los potenciales fármacos a probar mediante técnicas imagenológicas, principalmente por tomografía de emisión de positrones (PET), utilizando varios trazadores como ¹¹C-Metionina (marcador de metabolismo proteico que se usará como trazador de referencia, ya que es el radiofármaco más utilizado actualmente para la detección no invasiva de gliomas a nivel clínico), ¹¹C-Deuterodeprenil (marcador astrocitario por unión irreversible a la enzima monoamino oxidasa de tipo B, enzima involucrada en la degradación de neurotransmisores) y marcadores de proliferación como la ¹⁸F-FLT (timidina fluorada).

La optimización de modelos de glioma *in vivo* como herramienta en la investigación diagnóstica y terapéutica forma parte de un proyecto de investigación que involucra a varias instituciones y que está a la espera de financiación. Se espera poder contribuir al estado del arte de gliomas, campo donde la búsqueda de nuevos fármacos y estrategias de diagnóstico y terapia son de vital importancia con el fin de lograr una mejora en el pronóstico de los pacientes que sufren de esta enfermedad.

⁷⁶ Rakoff-Nahoum S. *Why Cancer and Inflammation?* Yale J Biol Med. 2006; 79(3-4): 123–130.

⁷⁷ Coussens LM, Werb Z. *Inflammation and cancer.* Nature. 2002;19-26;420(6917):860-7.