



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Selección del mejor HIT en la prevención de la resistencia anti-angiogénica y validación de biomarcadores implicados

Sònia Babiloni Simón

Tutores externos: Dr. Oriol Casanovas y Dra. Gabriela Jiménez Valerio

Tutor académico: Dr. Miquel Mulero Abellán

Tarragona, mayo 2019



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



ICO
Institut Català d'Oncologia



IDIBELL
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge



AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Dr. Oriol Casanovas por la oportunidad de realizar unas prácticas más extensas de lo habitual, de nueve meses, y la confianza depositada en mí tratándome como una integrante más de su grupo.

Principalmente, agradecer a la Dra. Gabriela Jiménez, mi tutora en el laboratorio, por toda su paciencia y tiempo invertido en mí desde el primer día. Por recibirme siempre con una sonrisa y dispuesta a resolver cualquier duda que se me planteara, que no eran pocas. Ella me ha guiado, aconsejado y enseñado todo lo que he aprendido para trabajar de forma independiente. Con ella no solamente he aprendido aspectos del laboratorio, sino también un mundo diferente asociado a la investigación, el mundo empresarial de las *start-up*, dándome la oportunidad de acompañarla a varios eventos y charlas donde presentaba el proyecto. Agradecerle porque me ha motivado, día a día, para seguir haciendo lo que me gusta y continuar mi formación, gracias Gaby.

También quiero agradecer a Mar Martínez por toda la ayuda, consejos y apoyo que día a día me daba para sentirme como en casa.

En general, a todos los miembros del laboratorio (estudiantes de doctorado y técnicos), fueran del propio grupo o no, por acogerme y tratarme como una más durante todo este tiempo.

Agradecer al Dr. Miquel Mulero, coordinador del grado de biotecnología y mi tutor académico, por tutorizar el trabajo y aconsejarme.

Finalmente quiero agradecer a mi familia y amigos por la constancia y paciencia que han tenido durante estos años de la carrera.



ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO	1
2. ACRÓNIMOS	2
3. RESUMEN	3
4. INTRODUCCIÓN	4
4.1. CÁNCER	4
4.1.1. Dianas terapéuticas del cáncer	5
4.1.1. Carcinoma de célula renal (CCR)	5
4.1. ANGIOGÉNESIS	6
4.1.1. Angiogénesis tumoral	6
4.1.2. Terapias anti-angiogénicas	8
4.1.3. Resistencia a las terapias anti -angiogénicas	10
4.2. PROCESO DE DESARROLLO DE UN FÁRMACO	13
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1. CULTIVOS CELULARES	15
6.1.1. Líneas CCRs	15
6.1.2. Otras líneas celulares	15
6.2. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	16
6.2.1. Ensayos de proliferación	16
6.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ESTABULACIÓN	16
6.3.1. Modelo	16
6.3.2. Implantación ortotópica de tumores renales en ratones atímicos	17
6.4. EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	18
6.4.1. Determinación de la ruta de administración	18
6.4.2. Diseño experimental tratamientos en tumores 786-O	18
6.3.4. Obtención y procesado de las muestras	19
6.5. DETECCIÓN PROTEICA DE RF-1 EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES.	20
6.6. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS.	21

7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1.	Resultados previos	22
7.2.	Evaluación de las nuevas moléculas en las células 786-o sh91.	23
7.3.	Evaluación de las nuevas moléculas en las células SN12C sh91.	26
7.4.	Evaluación <i>in vitro</i> del HIT101 y 103 en otras líneas celulares	30
7.5.	Evaluación <i>in vivo</i> de la toxicidad del HIT 103.	36
7.6.	Evaluación de la efectividad inicial del HIT 103.	36
7.7.	Valoración de RF-2 como posible biomarcador predictivo de respuesta a los tratamientos anti-angiogénicos.	40
8.	CONCLUSIONES	44
9.	PERSPECTIVAS DE FUTURO	45
10.	BIBLIOGRAFÍA	46
11.	AUTOEVALUACIÓN	47
12.	ANEXOS	48
I.	Protocolo EDU assay	48
II.	Protocolo ELISA	50
III.	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i> HIT 103 786-O sh91	52
IV.	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i> HIT 103 SN12C sh91	54
V.	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i> HIT 101 786-O sh91	56
VI.	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i> HIT 101 SN12C sh91	57
VII.	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i> HIT 101 y 103 MiaPaca-2	58
VIII.	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i> HIT 101 y 103 NCI-H1573	59



1. DATOS DEL CENTRO

El **Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge** es un centro de investigación en biomedicina creado en 2004, orientado en la mejora de los problemas de salud de las personas. Está situado en Hospitalet de Llobregat, al sur de Barcelona.

El centro consta con investigadores propios e integra la investigación del Hospital Universitario de Bellvitge i el Hospital de Viladecans, del Instituto Catalán de la Salud, el Instituto Catalán de Oncología (ICO), la Universidad de Barcelona i el Ayuntamiento de el Hospitalet de Llobregat.

La investigación en el IDIBELL se divide en tres grandes áreas- la del cáncer, la de las neurociencias y la de medicina traslacional. El objetivo común es la mejora del pronóstico del paciente, para conseguirlo se aborda desde del estudio molecular y rutas de señalización, así como también a las necesidades clínicas no resueltas para cada enfermedad. Para ello se lleva a cabo una investigación básica y clínica de alto nivel.

El grupo en el que he formado parte pertenece a un programa llamado **Programa Contra la Resistencia Terapéutica del Cáncer (ProCURE)**. **ProCURE** es un programa de investigación conjunto recientemente lanzado del Instituto Catalán de Oncología (ICO) y el Instituto Bellvitge de Investigación Biomédica (IDIBELL) destinado a abordar un problema clínico importante en oncología; La existencia o aparición de resistencia terapéutica.

2. ACRÓNIMOS

AG	Angiogénesis	MMP	Metaloproteinasas de matriz
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	°C	Grados centígrados
Ang	Angiopoyetina	PBS	Tampón fosfato salino
AR	Resistencia adquirida	PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
CCR	Carcinoma de célula renal	PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
CEs	Células endoteliales	PFA	Paraformaldehido
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	RF-1 i RF-2	Factor de Resistencia- 1 Factor de Resistencia- 2
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco	RI	Resistencia intrínseca
DOX	Doxiciclina	RNA	Ácido ribonucleico
ELISA	Ensayo por inmuno adsorción ligado a enzimas	RPMI	Medio Poswell Parl Memorial Institut
FBS	Suero bovino fetal	SEMA3s	Semaforina
FDA	Agencia Americana de medicamentos y alimentos	sh	Short Hairpin
FGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas	Switch	Del inglés interruptor
IL-8	Interleukina 8	TWEEN	Monooleato de Polioxietileno Sorbitan
ip	Intraperitoneal	ul	Mircolitro
mg	Miligramo	VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
ml	Mililitro	VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial
mm	Milímetro	vo	Vía oral

3. RESUMEN

El desarrollo de tumores y la posterior metástasis dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proceso llamado angiogénesis. La inhibición terapéutica de este proceso produce una fase inicial de efectividad sin embargo, tanto en la clínica como en modelos animales, observamos la aparición de resistencia al tratamiento, requiriendo un cambio a un segundo abordaje terapéutico. En nuestro laboratorio se ha descrito una nueva vía de escape metabólico a los fármacos anti-angiogénicos, validada como una novedosa *diana* terapéutica, el Factor de Resistencia- 1 (RF-1). Se realizó un análisis computacional de esta diana, obteniéndose diferentes HITs. Durante la realización de este trabajo se evaluaron los dos mejores HITs activos contra RF-1, el HIT 101 y HIT 103, en dos líneas celulares de cáncer renal (786-O y SN12C), una línea de adenocarcinoma de pulmón (NCI-H1573) y una línea de carcinoma pancreático (MiaPaca-2). Evaluándolos a distintas dosis con el objetivo de determinar la IC_{50} *in vitro*, así como una evaluación inicial de la seguridad, biodisponibilidad y eficacia del mejor HIT seleccionado. Paralelamente, se valida una nueva molécula también implicada en la vía de resistencia, el Factor de Resistencia- 2 (RF-2), como posible biomarcador sanguíneo de la resistencia al tratamiento anti-angiogénico.

Palabras clave: Vasos sanguíneos; angiogénesis; resistencia tumoral; inhibición terapéutica; anti-angiogénicos; diana terapéutica; cáncer renal; biomarcador.

Tumor growth and metastasis relies on angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing vascular beds, in order to receive an adequate supply of oxygen and nutrients. Therefore, targeting tumor angiogenesis has become of high clinical relevance. Nevertheless, resistance observed in several tumor types through alternative angiogenic “escape” pathways contributes to restoration of tumor growth. Our group in the laboratory recently described a new mechanism of tumor adaptation and relapse based on nucleoside catabolism that could be useful to prevent anti-angiogenic resistance. Has been done the target validation and the HIT identification through a Computational Drug Discovery analyzing our new therapeutic target, this analysis threw relevant scaffolds from these we analyzed different libraries and we filtered the structures until we had three possible HIT candidates. In this study was performed the *in vitro* evaluation to determine the IC_{50} of the two best HITs in RCC, lung and pancreatic adenocarcinoma cell lines. Moreover, using the best candidate we perform the *in vivo* evaluation of initial toxicity and effectivity. In parallel, another molecule implicated on nucleoside catabolism was validated as a biomarker of resistance to anti-angiogenic treatment.

Keywords: Blood vessels; angiogenesis; tumor resistance; therapeutic inhibition; anti-angiogenic; therapeutic target; Kidney cancer; biomarker

4. INTRODUCCIÓN

4.1. CÁNCER

Se han descrito una serie de eventos que permiten a una célula normal transformarse progresivamente en una célula cancerosa. Algunos de estos eventos son alteraciones genéticas y/o fenotípicas de las células; ciclos celulares anormales, donde se mantienen señales de proliferación constantes; evasión de los supresores de crecimiento e inhibición de la apoptosis; alteraciones en la adhesión celular; inducción de la angiogénesis y activación de la invasión y metástasis [7]. Esta transformación celular no permite mantener la homeostasis del tejido normal y dan lugar a lesiones neoplásicas. Sin embargo, un tumor no solamente se define por la formación de masas de células cancerosas, ya que estas cooperan con otros tipos celulares en el microambiente tumoral, como las células inmunitarias, células inflamatorias, células hematopoyéticas, y fibroblastos estromales. El balance de los factores que promueven la evolución progresiva a un estado neoplásico y los factores que lo inhiben determinan la agresividad y pronóstico del tumor [11].



FIGURA 1. Acontecimientos implicados en el proceso de desarrollo de un tumor. (Imagen adaptada de Hanahan y Weinberg 2011)

4.1.1. Dianas terapéuticas del cáncer

La mayoría de los fármacos contra el cáncer van dirigidos hacia dianas moleculares específicas que están implicadas en una o varias vías claves del proceso de formación de un tumor. La especificidad inhibitoria de una diana concreta es una propiedad muy efectiva, ya que por lo general, no presentan inhibición fuera de la diana, reduciendo toxicidad inespecífica. El desarrollo de los tumores y la posterior formación de la metástasis dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis tumoral, proceso que se explicará detalladamente en el apartado angiogénesis), por esta razón la inhibición de la angiogénesis es uno de los principales objetivos a los que se está enfocando el desarrollo de nuevas terapias [11]. Sin embargo, algunas células cancerosas tienen la capacidad de sobrevivir con una función residual hasta que ellas o su progenie finalmente se adaptan a la presión selectiva impuesta por la terapia. Dicha adaptación, puede ser debida a mutaciones, reprogramación epigenética o remodelación del microentorno tumoral, permitiendo un recrecimiento tumoral y una recaída clínica [7].

4.1.1. Carcinoma de célula renal (CCR)

El carcinoma de células renales de células claras (CCRcc) es un cáncer de riñón que se origina en los túbulos renales. Es el tipo más común de cáncer de riñón en adultos, responsable de aproximadamente 90 a 95% de las neoplasias. La población con mayor índice de afectación se centra en personas entre 50 y 70 años de edad y tiende a ser más frecuente en hombres. Este tipo de cáncer ocupa el 6to puesto en hombres y 8vo en mujeres entre las neoplasias más frecuentes a nivel mundial [8].

Estos tipos de tumores son dependientes del proceso angiogénico, consecuentemente comprenden de una densidad vascular muy elevada. Debido al importante rol que presenta este proceso en estos tumores, existe diversos abordajes terapéuticos enfocados en su inhibición. Siendo la vía de VEGF es la principal diana terapéutica.

Por otra parte, podemos decir que no existe ningún biomarcador validado para uso general como factor predictor de la respuesta a las terapias anti-angiogénicas.

4.1. ANGIOGÉNESIS

4.1.1. Angiogénesis tumoral

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, a diferencia de la neovascularización, que implica la formación de vasos sanguíneos completamente nuevos. En los procesos fisiológicos normales, la angiogénesis es un proceso dinámico que se activa transitoriamente durante el desarrollo embrionario, el ciclo reproductivo femenino y en la cicatrización de heridas. Durante el desarrollo tumoral, es necesaria la continua suministración de nutrientes y oxígeno hacia el tumor, así como poder deshacerse de los desechos metabólicos y el dióxido de nitrógeno, para ello activan y mantienen un “Switch” angiogénico donde las moléculas activadoras de la angiogénesis incrementan y las inhibidoras disminuyen. Este *switch* sobre regula la expresión y secreción de varias moléculas implicadas en el incremento de la proliferación y migración de las células endoteliales (*Tabla 1*) y la formación continua de nuevos vasos sanguíneos, que proporcionan la ayuda necesaria para el crecimiento de la masa tumoral y la posterior invasión (metástasis) [7].

Molécula	Función
<p>VEGF <i>Factor de crecimiento endotelial vascular</i></p>	<p>Principal factor estimulador de la angiogénesis. VEGF se une a los receptores de superficie VEGFR1 o VEGFR2 de las células endoteliales [12]. VEGF se encuentra expresado en muchos tipos de tumores humanos, y su elevada expresión está asociada a un peor pronóstico [8].</p>
<p>PDGF <i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</i></p>	<p>PDGF es un polipéptido dimérico. Este se une a los tres receptores diméricos (PDGFRs) para movilizar y reclutar las células alrededor de los tubos endoteliales, estabilizando y estimulando la maduración de los vasos sanguíneos. Es una de las causas principales de la resistencia a las terapias anti-VEGF [1, 4].</p>

FGF <i>Factor de crecimiento de fibroblastos</i>	FGF se une a uno de los cuatro receptores FGFs mediante los dominios intracelulares de la tirosin quinasa permitiendo la proliferación de células endoteliales y la formación de estructuras tubulares [4].
Ang <i>Angiopoyetinas</i>	La Ang-1 y Ang-2 son factores de crecimiento involucrados en la angiogénesis. [8]
IL-8 <i>Interleuquina 8</i>	Es una quimiocina producida por macrófagos y las células endoteliales, entre otras. Es un fuerte promotor de la angiogénesis [4].
Integrins	Son moléculas producidas por las células endoteliales, se unen a los componentes de la matriz extracelular regulando la angiogénesis.
MMP <i>Metaloproteinasa de matriz</i>	Moléculas involucradas en la degradación de las proteínas de las paredes de los vasos, permitiendo a las células endoteliales escapar de la matriz intersticial [4].
SEMA3s <i>Semaforinas</i>	Concretamente la semaforina de clase 3 regula la angiogénesis mediante la modulación de la adhesión de células endoteliales, la migración, la proliferación, la supervivencia y el reclutamiento de pericitos.

TABLA 1. Moléculas implicadas durante el proceso de la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso formado por cuatro etapas. Empieza con la unión de múltiples factores pro angiogénicos a los receptores de las células endoteliales (CEs), activando las vías de transducción de señales e incrementando así su proliferación celular y permeabilidad. En segundo lugar, se produce la degradación de la membrana basal por parte de varias enzimas, entre ellas las MMPs, para permitir a las CEs invadir el estroma del tejido adyacente y proliferar. A continuación, las CEs migradas, a través de estructuras tubulares multicelulares, por una parte, activan la formación de lúmenes formando los nuevos canales capilares, y por la otra, activan la expresión de integrinas que facilitarán su adhesión a la matriz extracelular. Finalmente, las angiopoyetinas estimularán el reclutamiento de pericitos que estabilizarán los nuevos vasos [12].

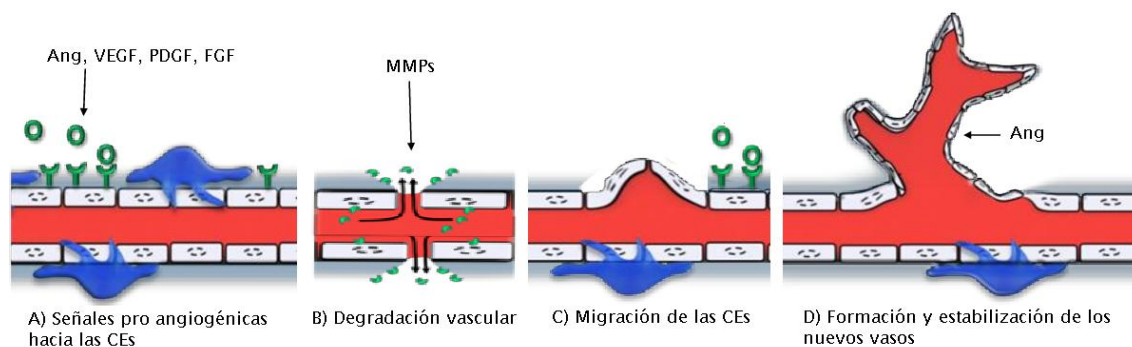


FIGURA 2. Etapas del proceso angiogénico. (Imagen adaptada de Alina-Andreea Zimta et al 2019)

La ramificación de la vasculatura tumoral es típicamente caótica, donde el final de los vasos ramificados son puntos muertos y hay áreas donde el flujo es intermitente e invertido, lo que puede afectar a la función vascular y conducir a regiones donde la perfusión disminuya y se cree hipoxia [9]. Estas condiciones de hipoxia, por una parte, sobre regulan el factor de transcripción hipoxia-inducible (HIF) y los genes dependientes de hipoxia, y por la otra, permiten la transcripción de factores de crecimiento pro-angiogénicos [1]. La hipoxia también permite la movilización de múltiples tipos de células madre desde la médula ósea y el reclutamiento de células inmunitarias hacia el microambiente tumoral, acelerando el proceso de la angiogénesis [9].

4.1.2. Terapias anti-angiogénicas

Las terapias anti-angiogénicas son aquellas que en vez de dirigirse a las células tumorales actúan inhibiendo el crecimiento de los vasos sanguíneos. Previenen el crecimiento del tumor en vez de afectar directamente a las células tumorales. Si comparamos las terapias convencionales (aquellas dirigidas a afectar directamente a las células tumorales), con las terapias anti-angiogénicas, podríamos decir que estas últimas son menos tóxicas debido a su alta selectividad e especificidad. Sin embargo, las terapias anti-angiogénicas pueden requerir un largo periodo de tratamiento [12].

Descubrir nuevos mecanismos moleculares implicados en el crecimiento del tumor permitirá estudiar nuevas posibles dianas terapéuticas y su uso para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

En 1971 Judah Folkman fue el primero en proponer la inhibición de la angiogénesis como un objetivo atractivo para la terapia contra el cáncer. Actualmente, más de 300 inhibidores de la angiogénesis se encuentran en este momento en diferentes fases de desarrollo clínico y existen varios fármacos aprobados tanto por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) como por “US Food and Drug Administration” (FDA) para el tratamiento de el carcinoma de célula renal (RCC). (Tabla 2)

Los fármacos anti-angiogénicos pueden clasificarse en dos grupos dependiendo del mecanismo de acción:

- 1- Fármacos “*Direct-acting*”. Estos fármacos actúan como inhibidores endógenos directamente sobre las células endoteliales. Previenen su proliferación, migración, o evitando el escape de la muerte celular, en respuesta a los inductores angiogénicos [4].
- 2- Fármacos “*Indirect-acting*”. Son fármacos que van dirigidos hacia las vías de señalización de las células tumorales responsables de la síntesis o secreción de moléculas pro-angiogénicas. Previenen la expresión o bloquea la actividad de la angiogénesis [4]. Un ejemplo son los inhibidores de mTOR que actúan en las vías de supervivencia de las células tumorales, reduciendo la expresión de VEGF.

Fármaco	Promotor	Tipo de inhibidor	Diana	Uso
Bevacizumab (Avastin®)	Genentech / Roche	Anticuerpo monoclonal	VEGF A	1ª línea de tratamiento
Sorafenib (Nexavar)	Bayer	Inhibidores de las tirosin quinasa	VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3, PDGFR, B-raf	1ª línea de tratamiento
Sunitinib (Sutent)	Pfizer	Inhibidores de las tirosin quinasa	VEGFR-1, VEGFR-2 ,	1ª línea de tratamiento

			VEGFR-3, PDGFRs	
Pazopanib (Votrient)	GlaxoSmithKline	Multikinasa	VEGFR, PDGFR, c-kit	1ª línea de tratamiento
Axitinib (Inlyta)	Pfizer	Inhibidores de las tirocin quinasa	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFRs, c-kit	2ª línea de tratamiento
Everolimus (Afinitor)	Novartis	Derivado de rapamicina	mTOR	2ª línea de tratamiento

TABLA 2. Fármacos anti-angiogénicos aprobados por las agencias reguladoras de medicamentos.

La implicación de la angiogénesis en la progresión tumoral y la utilización de ésta como diana terapéutica han sido extensamente descritas en la literatura y han culminado en la realización de exitosos ensayos clínicos con terapias anti-angiogénicas en ciertos tipos de cáncer [3, 5, 10]. En concreto se ha aprobado el uso de moléculas anti-angiogénicas, como por ejemplo el anticuerpo bloqueante de VEGF (bevacizumab, Avastin®) o moléculas químicas inhibidoras de los receptores de VEGF (Sunitinib, Sutent®; Sorafenib, Nexavar®) en pacientes de cáncer colonrectal, en cáncer renal y en carcinoma hepatocelular, respectivamente [3, 6]. Sin embargo, los efectos terapéuticos de dichas terapias son normalmente transitorios y tanto en la clínica como en modelos animales se ha observado la aparición de resistencia tumoral a los tratamientos anti-angiogénicos.

4.1.3. Resistencia a las terapias anti -angiogénicas

Inicialmente se creía que este tipo de terapias no iban a inducir resistencia, ya que van orientadas específicamente hacia las células endoteliales, las cuáles no muestran inestabilidad genética. Aun así, evidencias tanto experimentales como científicas muestran lo contrario [9].

La resistencia a las terapias anti-angiogénicas es un problema asociado a diversos tipos de cáncer, por esta razón su estudio es un reto muy importante.

Múltiples mecanismos han sido descritos implicados en el recrecimiento del tumor frente a administración de una terapia anti-angiogénica [1]. En concreto, los tumores renales pueden presentar una resistencia variable a la terapia anti-angiogénica, que puede ser resistencia intrínseca (IR) o resistencia adquirida (AR) progresivamente a lo largo del tratamiento [9]. (*Figura 3*)

La resistencia intrínseca a la terapia anti-angiogénica se refiere a la pérdida total de la respuesta a la terapia; está caracterizada por la indiferenciación tumoral, la cual no hay respuesta por el tratamiento. Este tipo de resistencia es debida a la gran cantidad de factores pro-angiogénicos que el tumor puede expresar a parte de VEGF, por lo que la terapia contra VEGF y sus receptores no es del todo efectiva ya que estaría inhibiendo una parte del proceso de la angiogénesis pero no el proceso completo, ya que existen un gran variedad de moléculas involucradas en este proceso (descrito en el apartado angiogénesis tumoral). Otro mecanismo asociado a la resistencia intrínseca ocurre cuando los tumores son capaces de utilizar la vasculatura del tejido normal adyacente para su crecimiento y no depender de la angiogénesis y del VEGF, a este proceso se le llama coopción vascular [2, 9].

Mientras que la resistencia adquirida permite al tumor tener la capacidad de evadir la inhibición terapéutica después de una fase inicial de efectividad. Muchos de los fármacos anti-angiogénicos presentan eficacia clínica en muchos pacientes, pero estos beneficios son revertidos por la adquisición de este tipo de resistencia. Se trata de una resistencia indirecta, es decir, no ha sido adquirida por mutaciones genéticas sino por diversos mecanismos, tales como:

- La activación de vías alternativas que permiten el crecimiento tumoral a pesar de que la diana terapéutica del fármaco anti-angiogénico siga inhibid [2].
- El reclutamiento de células progenitoras vasculares y monocitos pro-angiogénicos a causa de las condiciones de hipoxia que provoca el tratamiento anti-angiogénico. Estas células se acumulan tanto en la periferia del tumor como en el interior de la masa tumoral y tienen la capacidad de revascularizar el tumor [9].

- Los pericitos que recubren los vasos. Estos tienen la capacidad de recubrir los vasos y secretar VEGF junto a otros factores que permiten la supervivencia de las células endoteliales. Así cuando hay un elevado número de pericitos recubriendo los vasos de un tumor, este es más insensible al bloqueo de VEGF [9].

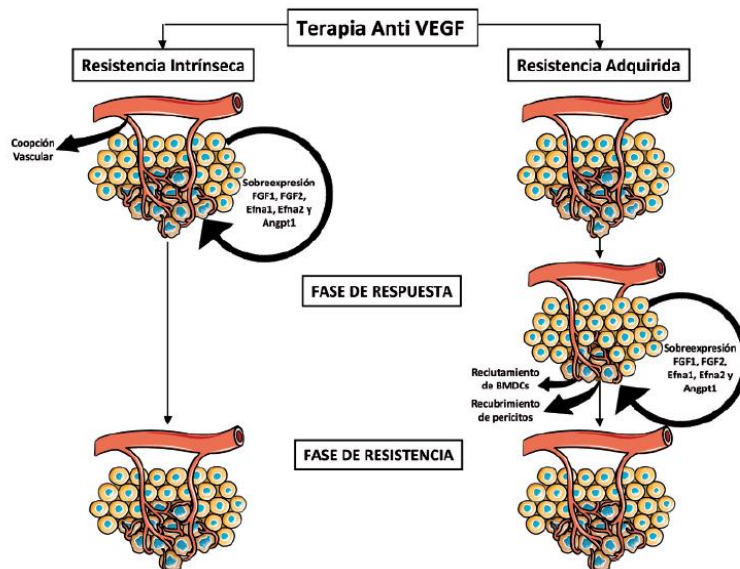


FIGURA 3. Tipos de resistencia a las terapias anti-angiogénicas en tumores renales. (Imagen Gabriela Jiménez-Valerio, Oriol Casanovas 2012)

En nuestro laboratorio se ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia adquirida y *target* angiogénico, el cual codificaremos por cuestiones de derechos de propiedad intelectual. Se trata de un nuevo factor involucrado en la resistencia al tratamiento anti-angiogénico. Lo denominaremos a partir de ahora cómo Factor de Resistencia- 1 (RF-1), podemos mencionar que es una enzima implicada en el metabolismo de nucleósidos (pirimidinas y purinas), y de gran interés en la actualidad por su implicación en angiogénesis y su correlación con el desarrollo agresivo de determinados procesos tumorales.

Nuestros estudios demuestran que, bajo la condición de la privación de nutrientes (efecto que producen las terapias anti-angiogénicas), las células cancerosas del riñón regulan la sobreexpresión de RF-1 y la metabolización de nucleósidos aportan ventajas de crecimiento considerables, lo que

sugiere un nuevo escape metabólico de los anti-angiogénicos y una nueva opción terapéutica para los pacientes resistentes a este tipo de terapias.

4.2. PROCESO DE DESARROLLO DE UN FÁRMACO

Identificar una necesidad médica no cubierta, es el primer paso para el desarrollo de un nuevo fármaco. Una vez determinada se procede a seguir una serie de fases secuenciales que pueden durar varios años hasta el objetivo final, la comercialización del nuevo fármaco.

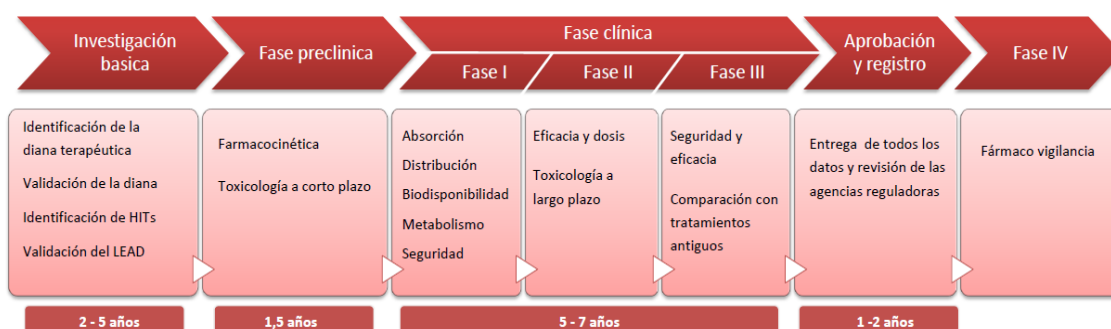


FIGURA 4. Proceso de desarrollo de un nuevo fármaco.

Por lo tanto, habiendo identificado una nueva diana terapéutica, la inhibición de la vía RF-1, se ha procedido a diseñar un nuevo fármaco que realice dicha función. Ahora nos encontramos en la fase de investigación básica. Durante la realización de este trabajo evaluaremos detalladamente a nuestro candidato HIT mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se evaluará el efecto del HIT a distintas dosis con el objetivo de determinar la IC_{50} con la realización de diferentes experimentos *in vitro*, así como también realizaremos la evaluación inicial de la seguridad, biodisponibilidad y eficacia. Paralelamente se realizarán modificaciones estructurales del HIT para optimizarlo y obtener el candidato LEAD, para el inicio de la fase preclínica.

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La mayoría de los pacientes tratados con fármacos anti-angiogénicos responden favorablemente durante un tiempo, pero a partir de 6 a 15 meses todos desarrollan resistencias a este tipo de tratamiento, requiriendo una segunda línea de tratamiento. Por lo tanto, haber identificado una diana terapéutica y tener la posibilidad de desarrollar un nuevo fármaco acompañado de un biomarcador de selección de pacientes, permitirá ofrecer una nueva opción terapéutica mucho más selectiva y eficaz para el tratamiento de los pacientes renales resistentes a las terapias anti-angiogénicas.

Objetivos:

1. Evaluación in vitro de la dosis - respuesta de los HITs 101 y 103 en líneas CCRs.
2. Evaluación in vitro del efecto de los HITs en otras líneas tumorales.
3. Evaluación in vivo de la toxicidad y efectividad del candidato LEAD.
4. Validación RF-2 como posible biomarcador de la resistencia al tratamiento anti-angiogénico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. CULTIVOS CELULARES

6.1.1. Líneas CCRs

Se utilizaron dos líneas celulares de CCR, las 786-O sh91 y las SN12C sh91. Estas líneas celulares habían sido previamente modificadas genéticamente mediante el sistema “*tet off*”. Sistema basado en la transfección de un vector que inhibe la expresión del gen RF-1 que inducen la inhibición del gen RF-1 en presencia de doxiciclina (DOX). Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con el 10% de FBS (suero fetal bovino), 2mM glutamina, 1mM HEPES pH 7.5, 2mM piruvato sódico, 50U/ml penicilina, 50µg/ml estreptomycin . Las células se incubaron en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ a 37°C.

6.1.2. Otras líneas celulares

Se utilizaron la línea celular NCI-H1573 de adenocarcinoma de pulmón, K562 de leucemia y las MIA PaCa-2 de adenocarcinoma pancreático. Estas líneas celulares fueron utilizadas ya que presentaban distintos niveles de RF-1 a nivel de RNA y queríamos comprobar si la inhibición de RF-1 podría ser relevante en otros tipos tumorales. Estas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) o DMEN (Gibco) suplementado con el 10% de FBS (suero fetal bovino), 2mM glutamina, 1mM HEPES pH 7.5, 2mM piruvato sódico, 50U/ml penicilina, 50µg/ml estreptomycin . Las células se incubaron en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ a 37°C.

6.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

6.2.1. Ensayos de proliferación

Para evaluar la proliferación celular, las células fueron sembradas directamente en placa y se dejaron en incubación durante 24-48h, dependiendo de la línea celular. Cuando se llegó a una densidad del 70-80% se cultivaron en medio completo RPMI o DMEM (condición control) o en las distintas concentraciones de las nuevas moléculas (HIT 103 y HIT 101) que se quisiera evaluar. Después de 24 horas, se marcaron las células en proliferación realizando un Ensayo EdU siguiendo las instrucciones del fabricante; mientras que los núcleos de las células fueron marcados con DAPI. Se tomaron 6 fotos por condición a un aumento de 20X con el microscopio ZEISS Apoptome.2 y se cuantificó el porcentaje de células en proliferación utilizando el programa de procesamiento de imagen digital *ImageJ*.

Para recopilar los resultados y analizarlos mediante gráficas se utilizó la herramienta informática *GraphPad Prism*. Los resultados se presentan como la mediana de los experimentos realizados según la condición. Consideramos estadísticamente significativo un p valor <0,05.

6.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ESTABULACIÓN

6.3.1. Modelo

Los animales utilizados en esta investigación son ratones atímicos nu/nu swiss (Harlan) machos de 4-5 semanas de edad y 18-22 g de peso, los cuales se mantuvieron a una temperatura de 20-22°C, en condiciones de esterilidad para evitar el contacto con patógenos, colocados en jaulas. Se les proporcionó comida y bebida *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo en cabinas de flujo laminar vertical, y los procedimientos a los que fueron sometidos los ratones estuvieron evaluados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de nuestro centro, CEEA-IDIBELL.



FIGURA 5. Ratón atímico. Carece de una glándula del timo normal y tiene un sistema inmunitario defectuoso debido a una mutación genética.

6.3.2. Implantación ortotópica de tumores renales en ratones atímicos

Células 786-O se inyectaron directamente en el riñón derecho (órgano neoplásico original) de ratones atímicos. Una vez inyectadas, las células tumorales fueron capaces de colonizar el riñón y desarrollar en aproximadamente 20 días una masa tumoral palpable que luego se perpetuó en pasajes sucesivos para obtener una cohorte experimental.

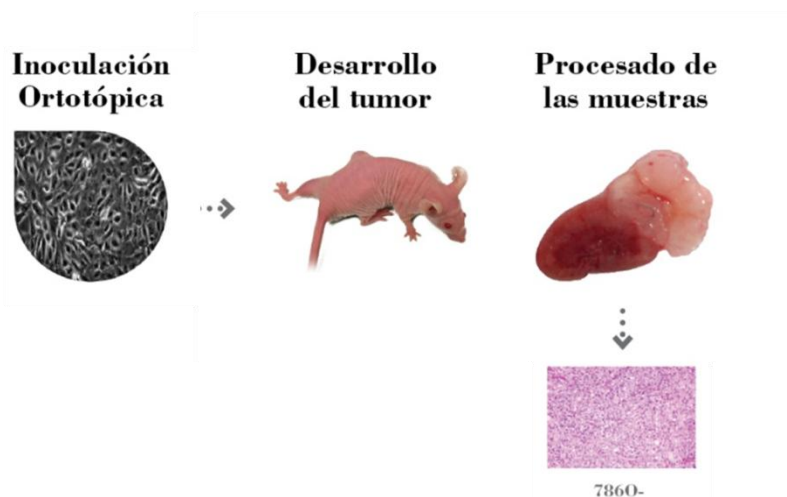


FIGURA 6. Esquema de implatación ortotópica de tumores renales en ratone atímicos

6.4. EXPERIMENTO *IN VIVO*

6.4.1. Determinación de la ruta de administración

Para determinar la mejor ruta de administración se administraron una alta concentración de las nuevas moléculas (HIT 103) por vía intraperitoneal (i.p.) y vía oral (v.o.) para evaluar la biodisponibilidad del fármaco. El HIT 103 fue disuelto con 2-Hydroxypropil β cyclodextrin al 10% y administrado a una concentración de 4mg/mL en un ratón vía i.p. y en dos ratones v.o. Se recogieron muestras de sangre a las 2h, 4h, 6h y 24h cuando fueron sacrificados se extrajeron los órganos para evaluarla evaluación histológica.

6.4.2. Diseño experimental tratamientos en tumores 786-O

Una vez que los tumores comenzaron a palpase (volumen aproximado de 1000 mm³) ver Figura 7 de volúmenes tumorales previamente establecidos, los ratones fueron randomizados en dos grupos: el grupo control que se les administró PBS 1X dos veces por semana i.p. (n = 4); y el grupo tratado que recibieron el anti-angiogénico DC101 dos veces por semana a una dosis de 1 mg / kg / i.p. (n = 10). El DC101 es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el VEGFR2 de ratón, se obtiene en el propio laboratorio a partir de un cultivo de hibridoma.

El crecimiento del tumor fue seguido de palpación dos veces por semana, y el tratamiento fue considerado como efectivo hasta que los tumores primarios aumentaron en un 50% su volumen inicial (1000mm³), por lo tanto, aproximadamente 1500 mm³ por palpación. En el momento de la resistencia, los animales tratados con DC101 se asignaron al azar en los siguientes grupos:

- DC101 , dosis de 1 mg / kg / día vía i.p. (n = 6)
- DC101 + HIT 103, dosis de 50 mg / kg / día vía i.p. (n = 2)
- DC101 + HIT 103, dosis de 100 mg / kg / día vía i.p. (n = 2).

El HIT 103 fue disuelto con 2-Hydroxypropilβcyclodextrin al 10% y sonificado durante 5 min para mejorar su solubilidad. Los ratones se sacrificaron después de 10 días de tratamiento, el peso del tejido tumoral y se procesaron para histología o análisis molecular.



FIGURA 7. Volúmenes en los tumores renales. (Imagen Gabriela Jiménez-Valerio. Oriol Casanovas 2012)

6.3.4. Obtención y procesado de las muestras

Los tejidos de los ratones sacrificados se procesaron para el posterior estudio histológico. Durante la extracción de los órganos se fijaron en formol tamponado al 4% durante 24h, a continuación se realizaron dos lavados con agua estéril y se procedió a su deshidratación (etanol 70%, etanol 96%, etanol absoluto y xilol) para finalmente pasarlos a parafina líquida a 60°C, para su posterior evaluación histológica.

Tras la extracción de la sangre de los ratones se procedió a la obtención del plasma. Para ello se centrifugó la muestra a 15.000rpm durante 10min, obteniéndose el plasma. Este fue extraído, almacenado a -80°C.

6.5. DETECCIÓN PROTEICA DE RF-1 EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES.

Evaluamos la expresión de RF-1 mediante la técnica de Western blotting.

Para la extracción de proteína se utilizó el tampón de lisis RIPA (0,1% SDS, 1% NP-40, 05% sodio deoxicolato, 50nM NaF, 5mM EDTA, 40nM β -glicerofosfato, 200nM ortovanado sódico, 100 μ M PMSF, 1 μ M pepsatina A, 1 μ g/ml leupeptina, 4 μ g/ml aprotinina). La cuantificación proteica se realizó mediante el kit "BCA protein assay kit", siguiendo el protocolo del fabricante.

Para la transferencia proteica primero se realizó la separación de proteínas mediante un gel de poli-acrilamida al 8% (4,8ml H₂O estéril, 2,5ml Resolving buffer pH 8.8, 2,7ml Acrilamida 30%, 100 μ l APS y 5 μ l TEMED) donde se cargaron 40 μ l de cada muestra. Se utilizaron membranas PVDF sometidas a un campo eléctrico de 100V durante 1 hora y media para la transferencia proteica.

Tras la transferencia se procedió al bloqueo de la membrana para evitar uniones inespecíficas. Para ellos se utilizó leche en polvo al 5% diluida con TBS 1X (TBS 10X: 99mM tris base y 1,49 M NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Pasado ese tiempo, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en agitación constante. (*Tabla 3*). Al día siguiente se realizaron tres lavados de la membrana con TBS 1X con tween al 0,1% y la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación (*Tabla 4*).

Finalmente, se lavó la membrana con TBS 1X con tween al 0,1% y para la detección de la señal se utilizó el método quimioluminiscente de revelado basado en la oxidación del limunol por parte de la peroxidasa unida al anticuerpo secundario (ECL Western Blotting Detection Regents).

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución
RF-1	Abcam	Ratón	1:200
Vinculina	Sigma	Ratón	1:2000

TABLA 3. Anticuerpos primarios y su concentración de uso utilizados para el western blot.

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución
Anti-ratón HRP	Amersham biosystem	Oveja	1:5000

TABLA 4. Anticuerpos secundarios y su concentración de uso utilizados para el western blot.

6.6. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS.

ELISA “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” es una técnica de inmunoensayo basada en la detección de un antígeno inmovilizado mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar una señal detectable, cambio de color. Utilizamos esta técnica para la detección de RF-2 en muestras de plasma de pacientes con cáncer renal proporcionados por el propio hospital.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. RESULTADOS PREVIOS

Tras haber identificado y validado la nueva diana terapéutica (RF-1) involucrada en la resistencia a los tratamientos anti-angiogénicos, se procedió a realizar un estudio computacional del target, como paso inicial para el desarrollo de una nueva entidad química. Este estudio reveló que el target presenta 2 sitios activos (alosterico y ortosesterico) y que ambos deben ser inhibidos para conseguir una mayor afinidad con el target, lo que se traduce en conseguir una mayor capacidad de inhibitoria. Posteriormente, se estudio la unión del target frente a diferentes moléculas disponibles en librerías públicas arrojando 48 posibles moléculas que podían ser activas contra RF-1, de estas se seleccionaron las 3 mejores por afinidad de unión y se evaluó su efectividad inicial a dosis altas (100 μ M) in vitro mediante ensayos de proliferación e invasión en las líneas celulares CCRs. Los resultados concluyeron que el HIT 103 fue el mejor y HIT 101 el segundo mejor inhibiendo RF-1. Estos resultados están reportados en el trabajo de Anna Vallverdú.

En este trabajo se continuó la evaluación de los posibles candidatos mediante estudios in vitro, para conocer la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) a la que son capaces de inhibir la función biológica específica de RF-1. Así como también, se realizó una primera evaluación de la toxicidad y la eficacia del mejor inhibidor.

Nombraremos a los HITs como AtG 101 y AtG 103, haciendo referencia al nombre del la *start-up* del proyecto, AngioTheraGnostics.

Por otra parte, en trabajos anteriores el grupo ha descrito que RF-1 también es un biomarcador de predicción de respuesta al tratamiento con anti-angiogénicos y en este trabajo se evaluó la posibilidad de que otro factor de la misma ruta biológica podría ser otro biomarcador complementario. A continuación presentaremos los resultados de ambos apartados.

7.2. EVALUACIÓN DE LAS NUEVAS MOLÉCULAS EN LAS CÉLULAS 786-O sh91.

7.2.1. Ensayo de proliferación HIT 103

Para este ensayo sembramos 10.000 células por pozo, realizamos duplicados por cada condición, la duración fue de 24 horas y se realizaron cuatro experimentos.

Las condiciones evaluadas fueron:

- Control :medio completo RPMI
- DOX: Doxiciclina a concentración de 5 μ M, control positivo de la inhibición de RF-1.
- HIT 103 a las concentraciones de: 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M, 0,0001 μ M, 0,00001 μ M y 0,000001 μ M.

En la *Figura 8* observamos:

- A) Fotos realizadas en el microscopio de fluorescencia a 20x, Núcleos marcados con DAPI y células en proliferación (EdU). Podemos observar que a concentraciones más elevadas del HIT 103 se produce un mayor efecto en la reducción de la proliferación celular, y a medida que reducimos la concentración vamos perdiendo dicho efecto.
- B) Representación gráfica del porcentaje de proliferación celular. El mayor efecto se produce entre las concentraciones de 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M, perdiéndose a partir de la concentración de 0,01 μ M. Las columnas muestran valores medios \pm SD de 2-3 experimentos independientes, * P <0.05, ** P <0.005 (prueba de Mann-Whitney).
- C) Curva dosis-respuesta del HIT 103. Datos normalizados a su referente control (células con medio completo) representando la máxima capacidad proliferativa de esta línea celular y representando la mínima capacidad proliferativa a la máxima dosis (100 μ M) de la nueva molécula utilizada.

Podemos observar que existe una pequeña variabilidad entre los experimentos realizados. Esto puede deberse a que hubo cambio en los lotes del FBS (suero fetal bovino) utilizados en los diferentes experimentos. Por lo tanto realizaremos nuevos experimentos para corroborar el valor de la IC₅₀ el cual estaría al rededor de 0,12μM.

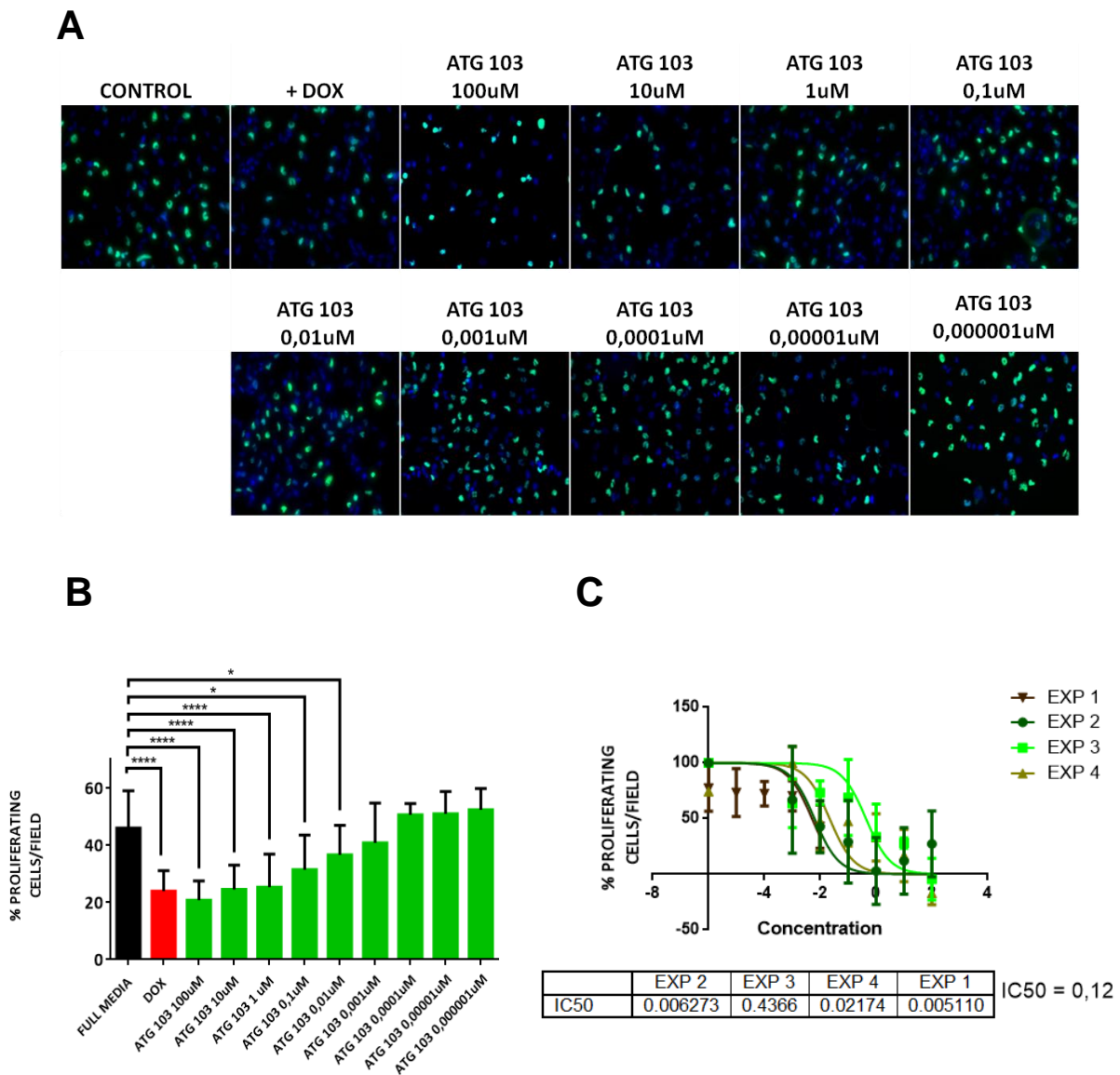


FIGURA 8. Figuras representativas de los experimentos realizados (N=4) con la línea celular 786-O sh91.

7.2.2. Ensayo de proliferación HIT 101

Para este ensayo se sembraron 10.000 células por pozo, realizando duplicados por cada condición, la duración fue de 24 horas y lo realizamos por triplicado.

Las condiciones evaluadas fueron:

- Control :medio completo RPMI
- DOX : Doxíciclina a concentración de 5 μ M, control positivo de la inhibición de RF-1.
- HIT 101 a las concentraciones de: 50 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M y 0,001 μ M.

En la *Figura 9* observamos:

- A) Fotos realizadas en el microscopio de fluorescencia a 20x núcleos marcados con DAPI y células en proliferación (EdU)..Observando las imágenes podemos ver que con la concentración de 50 μ M parece inhibir igual que con la inhibición genética (DOX).
- B) Representación gráfica del porcentaje de proliferación celular. Podemos observar que con el HIT 101 hay una leve reducción de la proliferación celular en respuesta a la concentración más alta, 50 μ M, equiparable a la inhibición genética de RF-1 utilizando Doxíciclina, pero esta reducción no suficiente para ser estadísticamente significativa. Las columnas muestran valores medios \pm SD de 2-3 experimentos independientes, * P <0.05, ** P <0.005 (prueba de Mann-Whitney).
- C) Curva dosis-respuesta del HIT 101. Datos normalizados a su referente control (células con medio completo) representando la máxima capacidad proliferativa de esta línea celular y representando la mínima capacidad proliferativa a la máxima dosis (50 μ M) de la nueva molécula utilizada. El valor aproximado de la IC₅₀ es de 13,44 μ M.

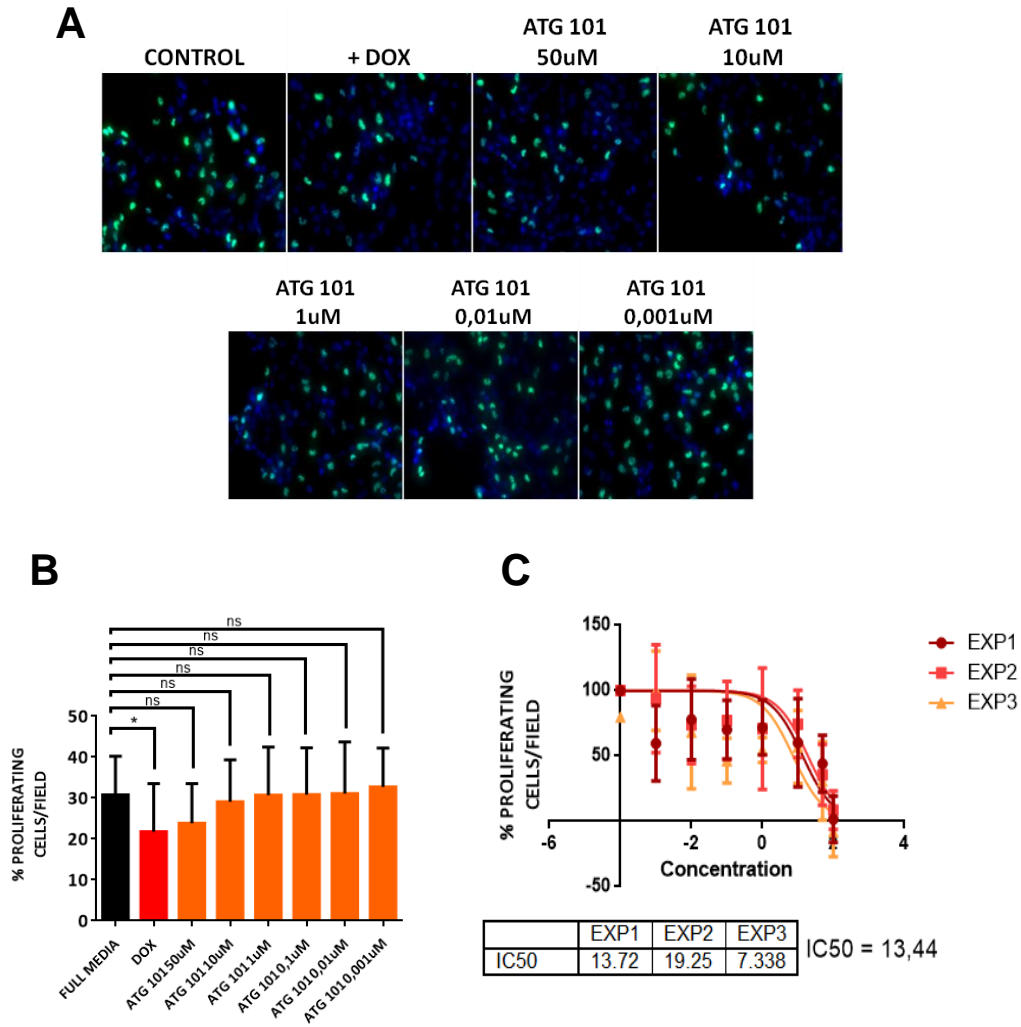


FIGURA 9. Figuras representativas de los experimentos realizados (N=3) con la línea celular 786-O sh91.

7.3. EVALUACIÓN DE LAS NUEVAS MOLÉCULAS EN LAS CÉLULAS SN12C sh91.

7.3.1. Ensayo de proliferación HIT 103

Para este ensayo se sembraron 25.000 células por pozo, realizando duplicados por cada condición, la duración fue de 24 horas y se realizaron cuatro experimentos.

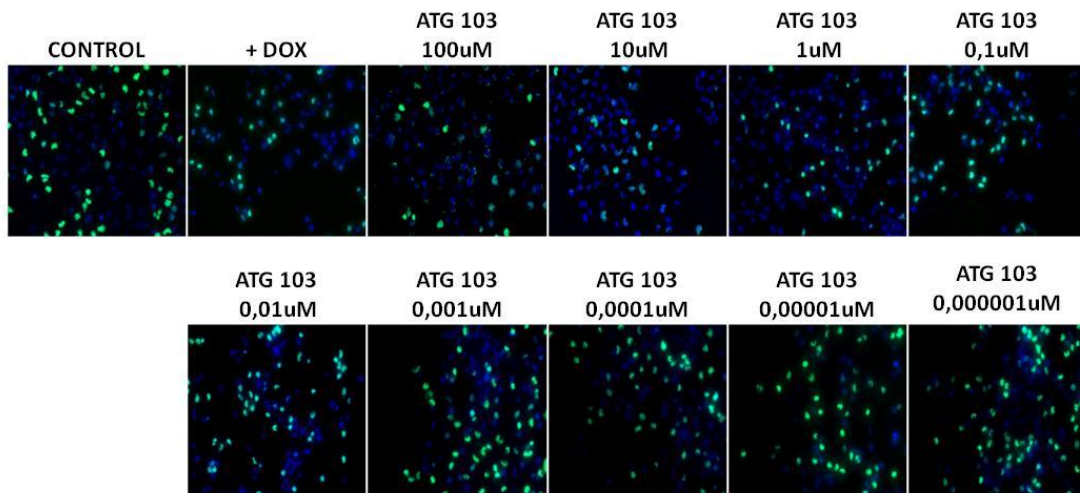
Las condiciones evaluadas fueron:

- Control :medio completo RPMI
- DOX: Doxiciplina a concentración de 5 μ M, control positivo de la inhibición de RF-1.
- HIT 103 a las concentraciones: 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M, 0,0001 μ M, 0,00001 μ M y 0,000001 μ M.

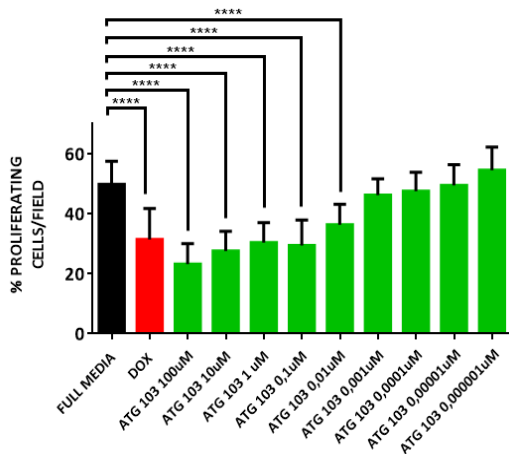
En la *Figura 10* observamos:

- A) Fotos realizadas en el microscopio de fluorescencia a 20x, núcleos marcados con DAPI y células en proliferación (EdU). Observando las imágenes podemos ver que a concentraciones más elevadas del HIT 103 se produce un mayor efecto en la reducción de la proliferación celular, y a medida que reducimos la concentración vamos perdiendo dicho efecto.
- B) Representación gráfica del porcentaje de proliferación celular. El mayor efecto se produce entre las concentraciones de 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M y 0,01 μ M, perdiéndose a partir de la concentración de 0,001 μ M. Las columnas muestran valores medios \pm SD de 2-3 experimentos independientes, * P <0.05, ** P <0.005 (prueba de Mann-Whitney).
- C) Curva dosis-respuesta del HIT 103. Datos normalizados a su referente control (células con medio completo) representando la máxima capacidad proliferativa de esta línea celular y representando la mínima capacidad proliferativa a la máxima dosis (100 μ M) de la nueva molécula utilizada. El valor de la IC₅₀ estaría al rededor de 0,01 μ M.

A



B



C

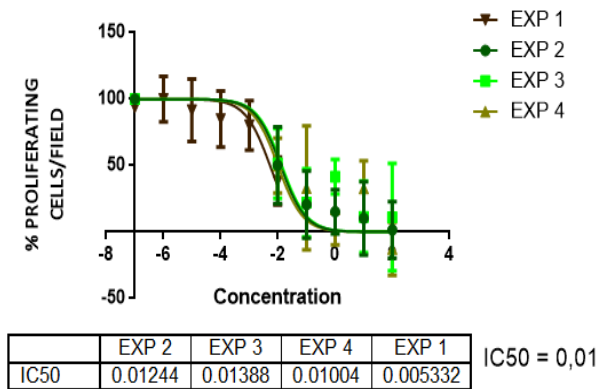


FIGURA 10. Figuras representativas de los experimentos realizados (N=3) con la línea celular SN12C sh91.

7.3.2. Ensayo de proliferación HIT 101

Para este ensayo se sembraron 25.000 células por pozo, realizando duplicados por cada condición, la duración fue de 24 horas y se realizó por triplicado.

Las condiciones evaluadas fueron:

- Control :medio completo RPMI
- DOX : Doxiciclina a concentración de 5µM, control positivo de la inhibición de RF-1.
- HIT 101a las concentraciones de: 50µM, 10µM, 1µM, 0,1µM, 0,01µM y 0,001µM.

En la *Figura 11* observamos:

- A) Fotos realizadas en el microscopio de fluorescencia a 20x, núcleos marcados con **DAPI** y células en proliferación (**EdU**). Observando las imágenes podemos ver que a concentraciones elevadas hay una notable reducción de la proliferación y que va aumentando a medida que reducimos concentraciones.
- B) Representación gráfica del porcentaje de proliferación celular. Podemos observar que con el HIT 101 el mayor efecto se produce entre las concentraciones de 50 μ M, 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M, perdiéndose a partir de la concentración de 0,01 μ M. Las columnas muestran valores medios \pm SD de 2-3 experimentos independientes, * P <0.05, ** P <0.005 (prueba de Mann-Whitney).
- C) Curva dosis-respuesta del HIT 101. Datos normalizados a su referente control (células con medio completo) representando la máxima capacidad proliferativa de esta línea celular y representando la mínima capacidad proliferativa a la máxima dosis (50uM) de la nueva molécula utilizada. El valor aproximado de la IC₅₀ es de 2,16 μ M.

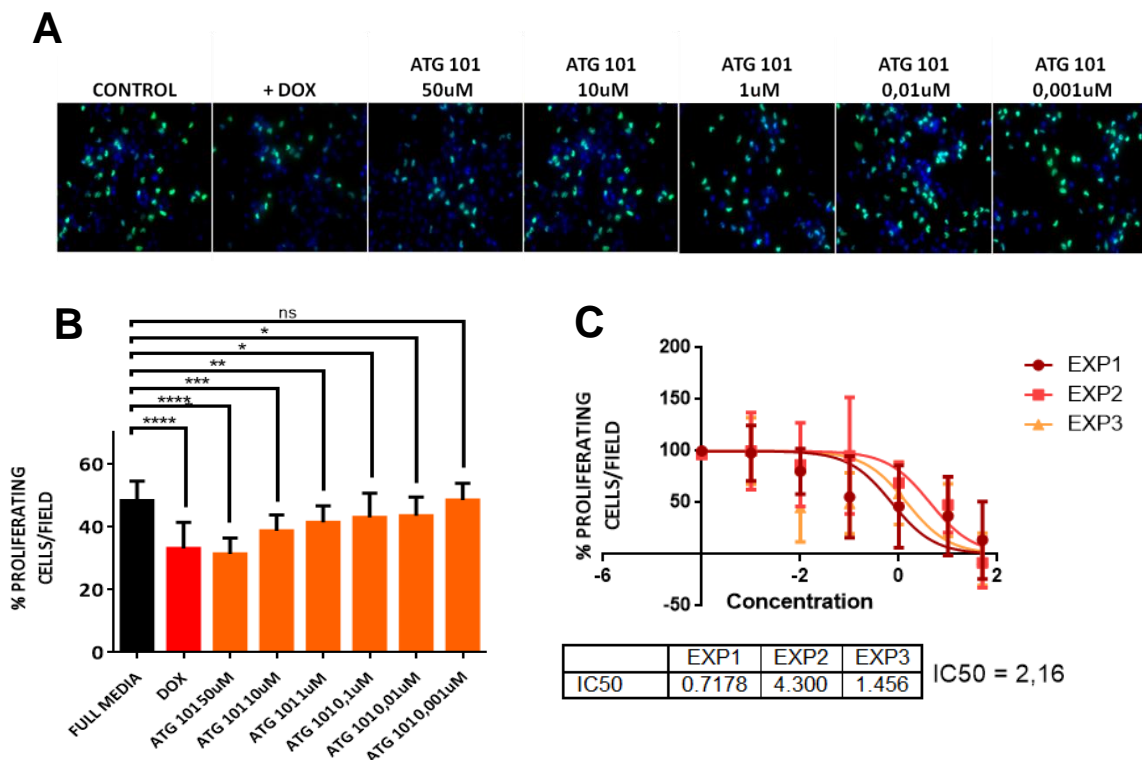
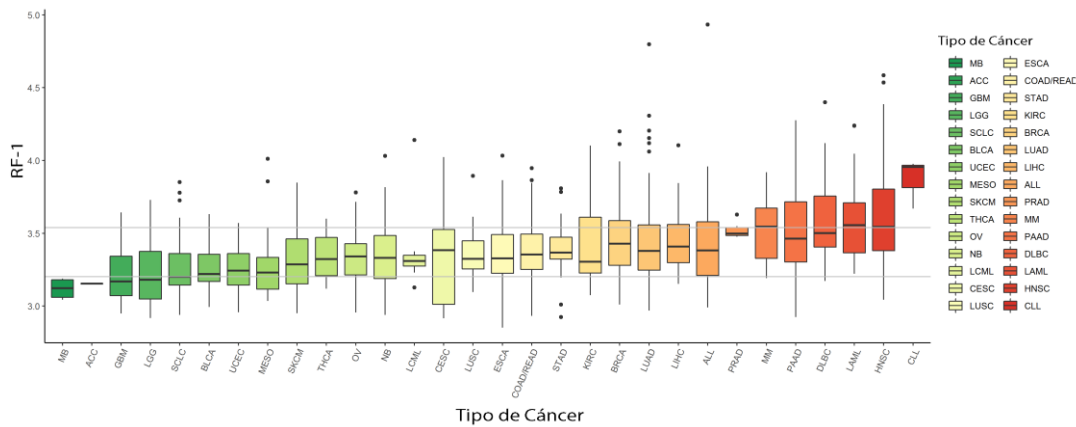


FIGURA 11. Figuras representativas de los experimentos realizados (N=3) con la línea celular SN12C sh91

7.4. EVALUACIÓN IN VITRO DEL HIT101 Y 103 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

7.4.1. Detección proteica de RF-1.

Nuestro servicio de bioinformática nos analizó la expresión de RF-1 en un estudio publicado en (ref). Se graficaron en función de la expresión de RF-1 (Figura 12).



Nombre	Tipo de Cáncer	RF-1	Enfermedad
NCI-H1573	LUAD	41.542	Adenocarcinoma de pulmón (estadio 4), derivado del sitio metastásico: tejido blando
K-562	LCML	41.400	Leucemia mielógena crónica (LMC), médula ósea
MIA-PaCa-2	PAAD	41.256	Carcinoma de páncreas
SN12C	KIRC	32.261	Carcinoma de célula renal

FIGURA 12 . Niveles de expresión de RF-1 en diferentes tipos de cáncer.

Para evaluar la inhibición de RF-1 escogimos algunas que presentaban una elevada expresión de RF-1. Escogimos las siguientes:

- NCI-H1573, generadas de un adenocarcinoma de pulmón
- K652 , leucemia
- MIA-PaCa-2, generadas de un carcinoma pancreático.

Lo primero que hicimos fue analizar la expresión de RF-1 mediante la técnica de Western blot obteniendo los siguientes resultados. (Figura 13)

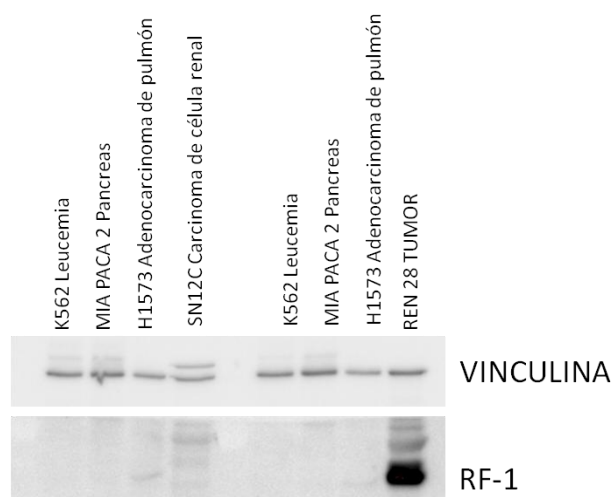


FIGURA 13. Western blot RF-; vinculina como control; líneas celulares de diferentes tipos de cáncer (K562,MIAPaCa-2, H1573 Y SN12C); tumor REN 28 como control positivo.

Podemos observar que RF-1 presenta una alta expresión en la muestra control tumor renal REN 28 y con una muy baja expresión en las líneas celulares SN12C y NCI-H1573. Mientras que las líneas K562 y MiaPaca-2 no se observa ninguna banda correspondiente a RF-1. Esto no quiere decir que carezcan de RF-1. Sino que se necesita una técnica más sensible que sea capaz de detectar niveles más bajos de la proteína como por espectrometría de masas.

Independientemente de estos resultados quisimos evaluar el efecto de inhibitoria de RF-1 en todas las líneas celulares (NCI-H1573 y MiaPaca-2), ya que sabíamos que a nivel de RNA todas expresaban RF-1.

7.4.2. Ensayo de proliferación en células NCI-H1573

Para este ensayo se sembraron 25.000 células por pozo, con duplicados para cada condición, la duración fue de 24 horas y se realizó por triplicado.

Las condiciones evaluadas fueron:

- Control :medio completo RPMI
- HIT 101 a concentración de 10µM, 1 µM y 0,1 µM
- HIT 103 a concentración de 10 µM, 1 µM y 0,1 µM .

En la *Figura 14* observamos:

- A) Fotos realizadas en el microscopio de fluorescencia a 20x, núcleos marcados con **DAPI** y células en proliferación (**EdU**). Observando las imágenes vemos que hay una menor proliferación en respuesta a la concentración de 10µM, tanto del HIT 101 como del HIT 103, siendo mejor con este último.
- B) Representación gráfica del porcentaje de proliferación celular. Observamos que aunque el HIT 101 produce una leve disminución de la proliferación a dosis de 10µM, el mejor efecto se observa con el HIT 103, reduciendo la proliferación a concentración de 10µM y 1µM; y perdiéndose al reducirse a 0,1µM. Las columnas muestran valores medios \pm SD de 2-3 experimentos independientes, * P <0.05, ** P <0.005 (prueba de Mann-Whitney).

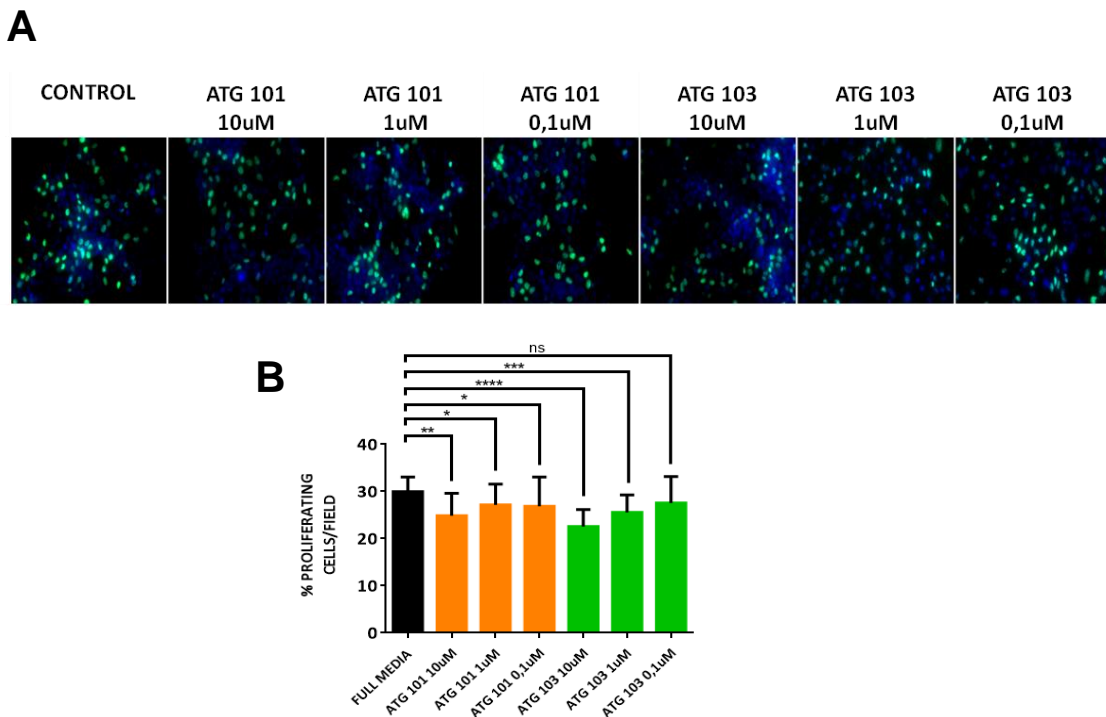


FIGURA 14. Figuras representativas de los experimentos realizados (N=3) con la línea celular NCI-H1573.

7.4.3. Ensayo de proliferación en células MiaPaca-2

.Para este ensayo se sembró 15.000 células por pozo, con duplicados para cada condición, la duración fue de 24 horas y se realizó por triplicado. Las condiciones evaluadas fueron:

- Control :medio completo RPMI
- HIT 101 a concentraciones de 10µM, 1 µM y 0,1 µM
- HIT 103 a concentraciones de 10 µM , 1 µM y 0,1 µM

En la *Figura 15* observamos:

- A) Fotos realizadas en el microscopio de fluorescencia a 20x, núcleos marcados con **DAPI** y células en proliferación (**EdU**). Con las imágenes no podemos observar cual de los HITs es el mejor, pero si observamos que a medida que disminuimos la concentración la proliferación aumenta.
- B) Representación gráfica del porcentaje de proliferación celular. Observamos que hay un mejor efecto con el HIT 103 a concentración de 10µM, y este se mantiene al reducir concentraciones a 1µM y 0,1µM. Este efecto también lo observa con el HIT 101 aunque los porcentajes de proliferación son ligeramente más altos. Las columnas muestran valores medios \pm SD de 2-3 experimentos independientes, * P <0.05, ** P <0.005.

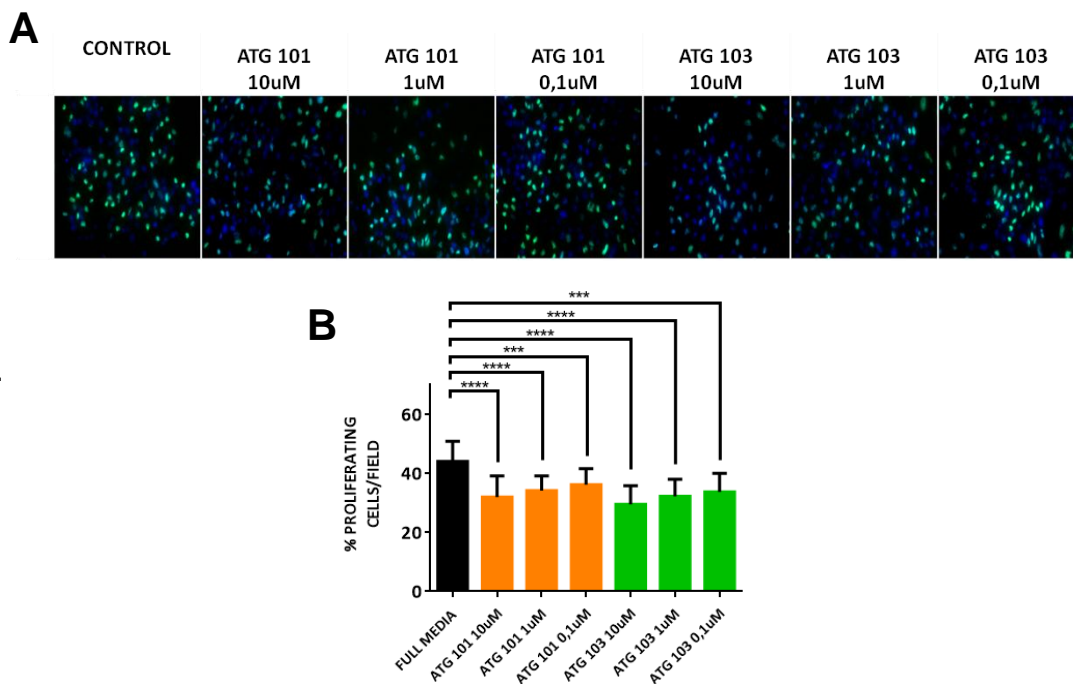


FIGURA 15. Figuras representativas de los experimentos realizados (N=3) con la línea celular MiaPaca-2.

Discusión de la evaluación *in vitro* de las nuevas moléculas

El mayor efecto del HIT 103 lo observamos en las SN12C sh91, siendo el IC₅₀ de aproximadamente 0,01μM, mientras que en las 786-O sh91 fue de 0,12μM. El HIT 101 fue el segundo mejor inhibiendo RF-1, observamos que en las células 786-O sh91 presentó un IC₅₀ de 13,44μM, ya que resultó ser efectivo sólo a concentraciones elevadas de 100 y 50μM. Mientras que en las SN12C sh91 con el HIT 101, con un IC₅₀ de 2,16μM, observábamos un efecto inhibitorio de la proliferación de hasta concentraciones más bajas. Comparando las dos líneas celulares CCR podemos decir que las células SN12C sh91 son las que mejor responden tanto al HIT 101 como al HIT 103, siendo este último el mejor. Esta mejor respuesta observada en la línea celular SN12C sh91 puede ser debida a que esta línea celular podría ser más dependiente de la vía de RF-1 para su crecimiento. Se necesitarán más estudios para corroborar esta hipótesis.

		IC ₅₀	Concentraciones donde hay efecto terapéutico	Concentración a la que perdemos el efecto
786-O sh91	HIT 103	0,12	100μM – 0,1μM	< 0,01μM
	HIT 101	13,44	100μM	< 50μM

SN12C sh91	HIT 103	0,01	100μ - 0,01μM	< 0,001μM
	HIT 101	2,16	50μM – 0,1μM	< 0,1μM

En cuanto a las otras líneas celulares donde evaluamos la efectividad de la inhibición de RF-1. Observamos que:

1. La inhibición de RF-1 disminuye la proliferación celular en todas ellas (NCI-H1573 y MiaPaca-2)
2. Al igual que en las células renales observamos una curva de respuesta en función de la dosis.
3. Las dosis más efectiva para cada una de ellas es la siguientes:

		Concentraciones donde hay efecto terapéutico	Concentración a la que perdemos el efecto
NCI-H1753	HIT 103	10µM – 1µM	< 0,1µM
	HIT 101	10µM – 0,1µM	< 0,1µM

MiaPaca-2	HIT 103	10µ - 0, 1µM	< 0,1µM
	HIT 101	10µM – 0,1µM	< 0,1µM

Por último si comparamos los resultados observados en estas líneas, podemos ver que la línea celular que mejor responde a la inhibición de RF-1 es la línea de pulmón (NCI-H1573) ya que es la que presenta niveles más elevados de expresión de RF-1 tanto a nivel de RNA cómo a nivel de proteína. Sin embargo, el HIT 103 es el compuesto más efectivo inhibiendo la proliferación celular. Podemos ver que la línea celular de pulmón responde mejor a los dos HITs debido a la alta expresión de RF-1 en comparación con la de páncreas. Aún así, en ambas observamos inhibición de RF-1 con los dos HITs tanto en la concentración alta como en la más baja, siendo el HIT 103 el que mejor inhibe la vía de RF-1.

Como hemos podido observar, el HIT 103 es la molécula que produce un mayor efecto inhibiendo RF-1 a dosis más bajas y consecuentemente, su IC₅₀ es menor en todas las líneas celulares.

Una vez evaluados los efectos *in vitro* y con la conclusión del HIT 103 como la molécula que presentó la inhibición más efectiva de RF-1, teniendo un IC₅₀ de 0,01µM, quisimos evaluarlo *in vivo* con el objetivo de evaluar la posible toxicidad, seguridad y eficacia de este nuevo compuesto-

7.5. EVALUACIÓN IN VIVO DE LA TOXICIDAD DEL HIT 103.

En este experimento administramos una alta dosis (100mg/kg) del HIT 103 por vía oral y vía intraperitoneal, observamos el estado general de los animales y recogimos el plasma de los ratones a diferentes horas 2, 4, 8, y 24 horas.

Posterior a la administración del HIT 103, no se observó ningún efecto en el estado general de los animales. Indicándonos que no era tóxico ni capaz de producir la muerte en los animales. Por lo tanto, se procederá la cantidad de fármaco circulante a las diferentes horas de extracción para obtener la vida media del fármaco. Las muestras de plasma obtenidas están siendo analizadas en el departamento de Farmacia del Instituto Catalán de Oncología.

7.6. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD INICIAL DEL HIT 103.

Observamos que la administración de una dosis alta del HIT 103 no era capaz de producir ningún efecto tóxico visible en el tumor, decidimos realizar un experimento de efectividad inicial del HIT 103 en tumores generados a partir de la línea celular de cáncer renal 786O-.

Una vez implantados los ratones y alcanzado el volumen tumoral de inicio de experimento (1000mm³) se randomizaron en diferentes grupos de tratamientos:

Control (PBS IP); DC101 (mouse anti-VEGFR2; 1 mg/kg/ip dos veces a la semana) hasta la adquisición de resistencia. Incremento del 50% del volumen inicial del experimento 1500mm³. Una vez alcanzada la resistencia a la primera

línea de tratamiento (DC101). Randomizamos nuevamente en 3 grupos para probar la efectividad de la inhibición de RF-1 utilizando el HIT 103 + DC101 continuo y evaluamos dos concentraciones del HIT 103, 50mg/kg/día y 100mg/kg/día. Es importante mencionar que la dosis de 50mg/kg estaba mejor disuelta que la de 100mg/kg, ya que decidimos disolver el HIT 103 en el mismo volumen e inyectar siempre la misma cantidad fármaco por ratón.

El experimento finalizó a los 10 días posteriores a la aparición de resistencia. Sin embargo, si algún ratón presentaba síntomas de disminución notable de peso se sacrificaba siguiendo las normas de bienestar animal. Una vez sacrificados los ratones se realizó la medición del volumen, peso tumoral y recolección de muestras para su posterior procesado.

7.6.1. Determinación de la progresión tumoral

Se realizó mediante palpación dos veces por semana a lo largo del experimento. A continuación observamos como fue el crecimiento tumoral de los diferentes grupos experimentales. DC101 continuo, continúa creciendo independientemente de la presencia del tratamiento. Mientras que en los grupos donde se adicionaba la inhibición de RF-1 tanto a dosis de 50mg/kg/día como a dosis de 100mg/kg/día se observa una disminución del crecimiento tumoral. Sin embargo, observamos que existe una mayor disminución del volumen tumoral en la dosis baja, esto puede deberse a que el fármaco probablemente esté mejor disuelto.

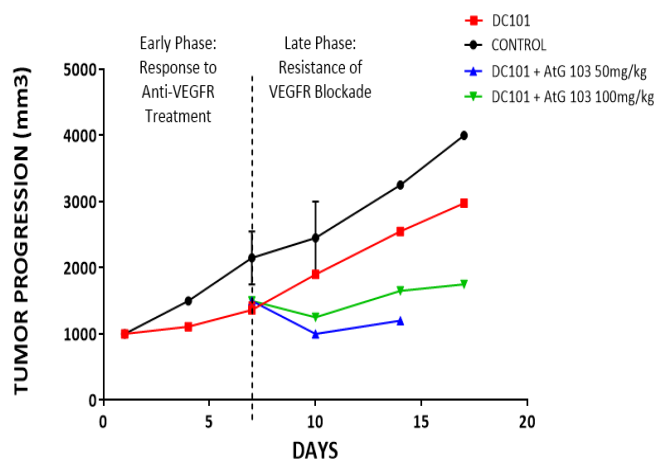


FIGURA 16. Progresión del volumen tumoral con las diversas condiciones.

7.6.2. Determinación del peso tumoral a punto final del experimento.

Después de realizar el sacrificio de los ratones y la obtención de órganos, medimos en una báscula calibrada el volumen tumoral de cada animal, midiendo el riñón junto al tumor. A continuación la gráfica. Obtuvimos el volumen tumoral de cada ratón

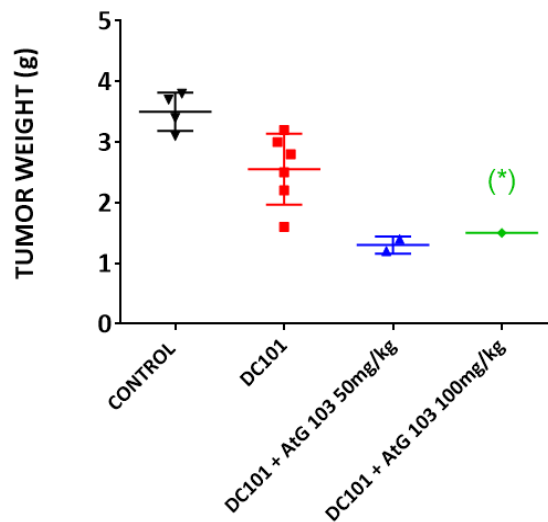


FIGURA 17. Peso de los tumores a punto final del experimento..

Podemos observar una disminución de peso tumoral en los tumores tratados con el HIT 103 en comparación con el tratamiento DC101 continuo. .Uno de los ratones tratados con la dosis alta del HIT 103 lo hemos puesto como *out layer*, ya que el tumor fue difícil de palpar y al sacrificarlo nos percatamos que el tumor era más grande de lo que estábamos palpando. Este es un experimento para evaluar la efectividad inicial del fármaco. Se necesitaría un número de ratones más elevado para hacer una evaluación más exhaustiva del efecto de la inhibición de RF-1 con el HIT 103, podemos mencionar que para ser una evaluación inicial el resultado es positivo.

7.6.3. Afectaciones al peso de los animales durante el tratamiento continuo.

Se realizó un seguimiento diario del peso de los ratones para evaluar si la administración del HIT 103 producía una disminución del peso tumoral en los ratones, obtuvimos los siguientes resultados.

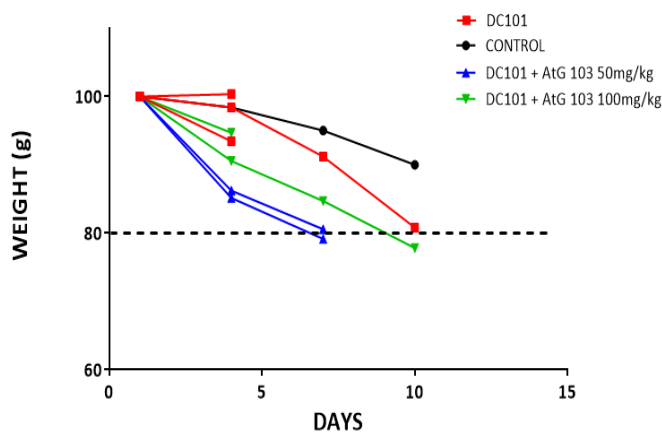


FIGURA 18. Seguimiento del peso de los ratones del experimento.

Observamos que el tratamiento durante 10 días con el HIT 103 no reduce en más de un 20% el peso en los tumores. Sin embargo, podemos observar que la pendiente más pronunciada es la que corresponde con el tratamiento combinado DC101 + HIT 103 a dosis 50mg/kg/día. Esto puede ser debido a que el fármaco estaba mejor disuelto existiendo una mayor efectividad pero también un mayor efecto en la disminución del peso. En futuros experimentos incrementaremos el número de animales para tener un número más representativo.

7.6.4. Problemas de solubilidad

A pesar de observar un efecto anti-tumoral del HIT 103, tras el sacrificio de los ratones observamos pequeñas acumulaciones del fármaco en la cavidad intraperitoneal. Estas acumulaciones eran mayores en los ratones tratados con la dosis más alta, indicándonos que el fármaco no estaba del todo disuelto en el vehículo que empleamos. Para futuros experimentos se deberá mejorar la solubilidad del fármaco y evitar acumulaciones del mismo.

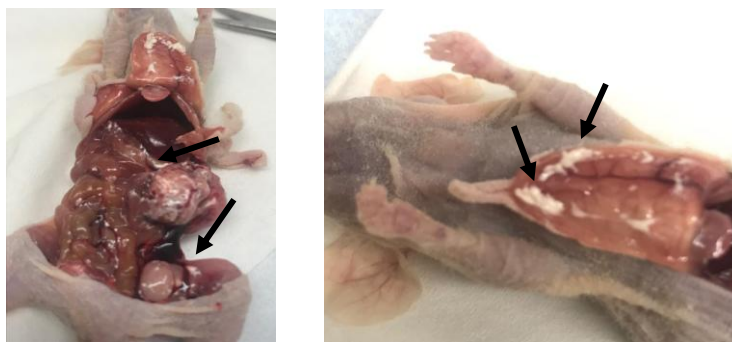


FIGURA 19. Problemas de solubilidad del fármaco HIT 103. (Ratón del grupo con el tratamiento DC101 + HIT 103 100mg/kg)

Del experimento in vivo, podemos mencionar que el HIT103, presenta un aceptable perfil de toxicidad, es efectivo disminuyendo el crecimiento tumoral tanto a dosis de 50mg/kg/día y 100mg/kg/día. Presenta problemas de solubilidad en el agente empleado para disolverlo y que este problema debe solucionarse antes de la realización de un nuevo experimento con una mayor número de animales.

7.7. VALORACIÓN DE RF-2 COMO POSIBLE BIOMARCADOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LOS TRATAMIENTOS ANTI-ANGIOGÉNICOS.

Resultados previos del grupo de investigación han descrito el que RF-1 puede ser utilizado como biomarcador de predicción de respuesta al tratamiento con anti-angiogénicos (primera línea de tratamiento del cáncer renal). Estos resultados han sido demostrados y están descritos en una patente del grupo.

Sabemos que RF-1 es una enzima implicada en el catabolismo de bases nitrogenadas. Uno de los objetivos planteados para este trabajo fue valorar si otra enzima de esta vía, Factor de Resistencia- 2 (RF-2) podría ser utilizada como junto a RF-1 como biomarcador de predicción de respuesta.

Disponíamos de de muestras de plasma de pacientes con cáncer renal, antes de recibir el tratamiento con anti-angiogénicos, lo primero que evaluamos

fueron los niveles basales de donantes sanos en comparación a los niveles basales de RF-2 y RF-1 en pacientes con cáncer renal. Podemos observar que RF-1 no está expresado en los donantes sanos, mientras que su valor incrementa en los pacientes que presentan tumor. Indicándonos que RF-1 es un factor solo liberado a la sangre cuando existe una condición tumoral en el paciente. En la evaluación de RF-2 observamos que los niveles de RF-2 eran mucho más elevados respecto a los de RF-1. Por otra parte, no se observó diferencia entre los donantes sanos y los pacientes con cáncer renal. (Figura 20)

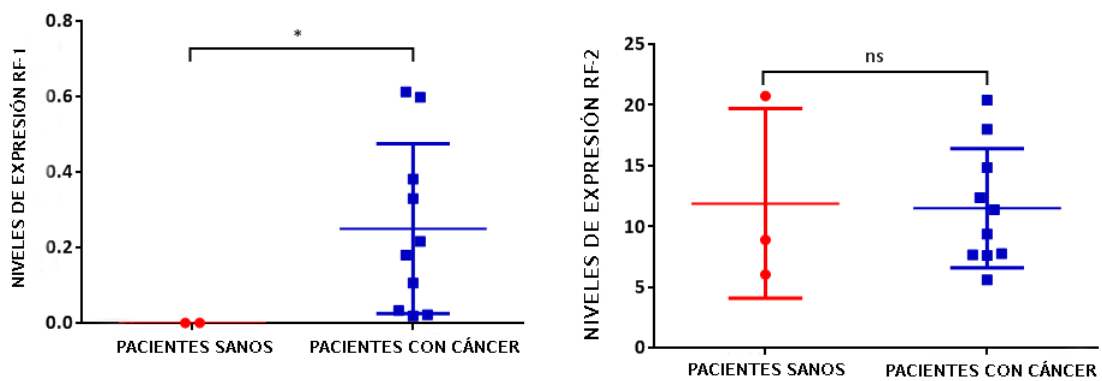


FIGURA 20. Niveles basales de RF-1 y RF-2 en muestras de plasma de pacientes sanos y pacientes con cáncer renal.

Como no observamos diferencias quisimos analizar los niveles de RF-2 y su asociación con la progresión de repuesta en pacientes (Figura 20).

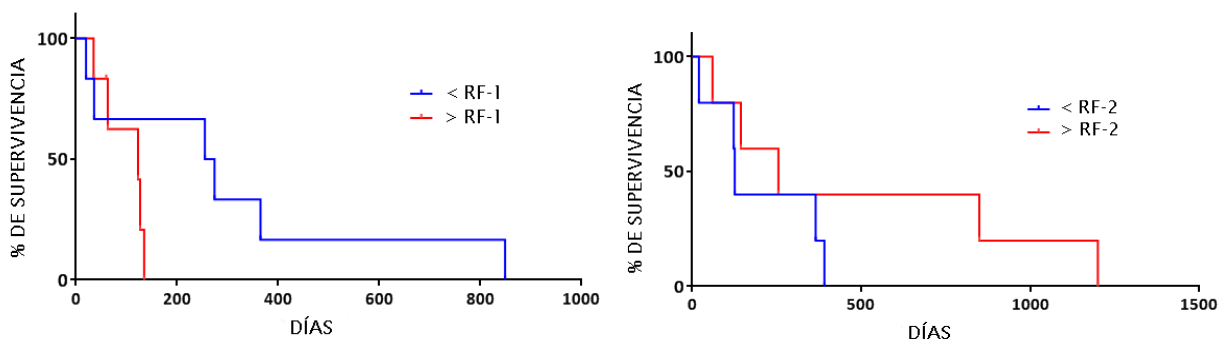


FIGURA 21. Curva de Supervivencia Kapla-Meier de los pacientes con diferentes niveles de expresión de RF_1 y RF-2.

Observamos que la asociación que existe entre mayores niveles de RF-1 y una peor progresión en los pacientes no se observaba al evaluar RF-2 y asociarlo a una peor progresión en los pacientes. Por lo tanto esta evaluación inicial nos confirmó que RF-2 parece no ser un biomarcador de predicción de respuesta al tratamiento con anti-angiogénicos.

Por último, quisimos comparar los niveles de una misma muestra para RF-1 y RF-2 y saber si se existía alguna correlación entre los distintos valores. Como podemos observar no existe ninguna correlación ni positiva ni negativa entre ambos valores (Figura 22 y 23). Por lo tanto podemos mencionar que no parece existir ninguna relación entre estos factores. A nivel de plasma.

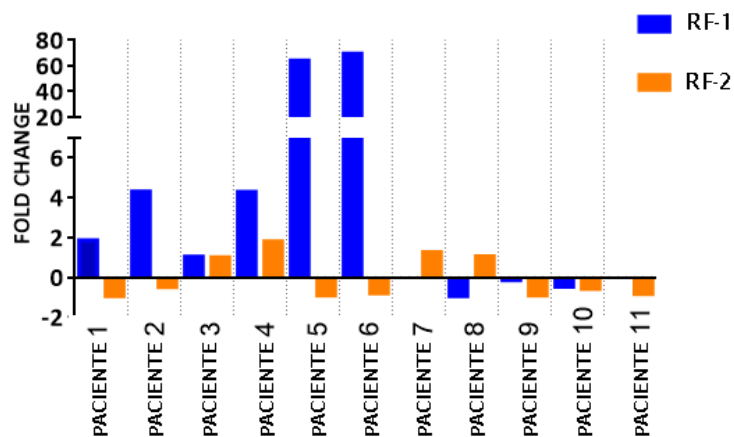


FIGURA 22. Fold change de los niveles de RF-1 y RF-2 en muestras de plasma de pacientes con cáncer renal, pre y post tratamiento.

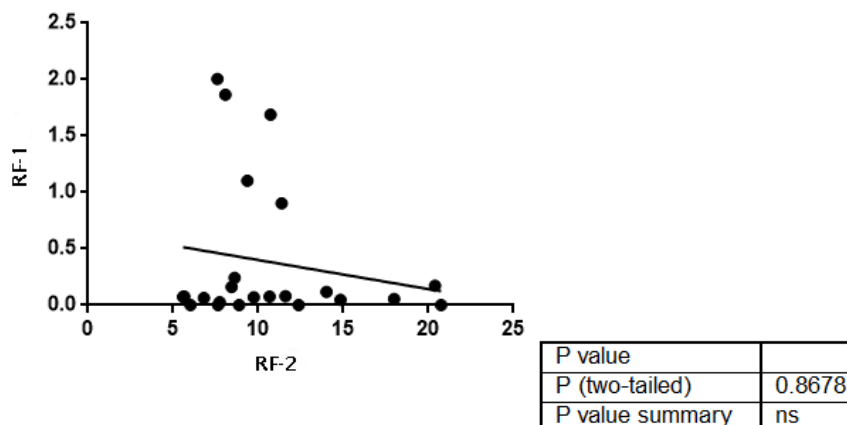


FIGURA 23. Correlación de niveles de RF-1 y RF-2 en muestras de plasma de pacientes con cáncer pre y post tratamiento renal.

A pesar de que ambas moléculas están implicadas en una misma vía metabólica y con funciones parecida, su expresión a nivel de plasma no parece estar relacionada. Por lo que no podemos validar a RF-2 como posible biomarcador sanguíneo de predicción de respuesta. Se realizarán futuros estudios para incluir más pacientes, otros tipos de tumores y también se evaluará biopsias de tejido de distintos pacientes.

8. CONCLUSIONES

1. La inhibición de RF-1 disminuye la proliferación celular de las líneas CCR, donde observamos una curva de respuesta en función de la dosis. La mayor inhibición de RF-1 se observa con el HIT 103 en las SN12C sh91, siendo el IC_{50} de aproximadamente $0,01\mu M$, mientras que en las 786-O sh91 fue de $0,12\mu M$. Un menor efecto observamos con el HIT 101 en las células 786-O sh91 siendo el IC_{50} de $13,44\mu M$, mientras que en las SN12C sh91 fue de $2,16\mu M$.
2. La inhibición de RF-1 disminuye la proliferación celular en las líneas celulares de pulmón (NCI-H1573) y páncreas (MiaPaca-2) también observándose una curva de respuesta en función de la dosis. En la línea NCI-H1573 el HIT 103 a la concentración de $10\mu M$ produce la mejor inhibición de RF-1. En la línea MiaPaca-2 el HIT 101 y el HIT 103 producen el mismo efecto de inhibición de la diana
3. La inhibición de RF-1 con el HIT 103 al momento de resistencia, produce una disminución de peso y volumen tumoral. Indicándonos que puede ser un buen candidato a seguir evaluando y optimizando para la obtención de una nueva familia de moléculas con actividad terapéutica.
4. Determinamos que RF2- no puede ser utilizado como un biomarcador sanguíneo para predecir la respuesta de los pacientes renales a las terapias anti-angiogénicas.

9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Se continuarán haciendo modificaciones en la estructura del HIT 103 para optimizar a nuestro candidato, una vez modificada la estructura y mejoradas las propiedades fisicoquímicas de solubilidad y estabilidad se realizaran experimentos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para continuar evaluando todas las propiedades del HIT 103 hasta llegar a un candidato LEAD y desarrollar su perfil preclínico.

En cuanto a RF-2, incluiremos más muestras para el estudio para terminar de descartar su rol en la predicción de respuesta al tratamiento anti-angiogénico.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Husein, B., Abdalla, M., Trepte, M., DeRemer, D. L. & Somanath, P. R. Antiangiogenic therapy for cancer: An update. *Pharmacotherapy* **32**, 1095–1111 (2012).
2. Azam, F., Mehta, S. & Harris, A. L. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *Eur. J. Cancer* **46**, 1323–1332 (2010).
3. De Gramont, A. & Van Cutsem, E. Investigating the potential of bevacizumab in other indications: Metastatic renal cell, non-small cell lung, pancreatic and breast cancer. *Oncology* (2005). doi:10.1159/000088483
4. El-Kenawi, A. E. & El-Remessy, A. B. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: Mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *Br. J. Pharmacol.* **170**, 712–729 (2013).
5. Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* (1992).
6. Folkman, J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* (2007). doi:10.1038/nrd2115
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
8. Jim, G. A. & Barcelona, V. Mecanismos de resistencia a antiangiogénicos en modelos murinos de cáncer renal. (2013).
9. Jiménez-Valerio, G. & Casanovas, O. Anti-angiogenic therapy for cancer and the mechanisms of tumor resistance. *Contrib. to Sci.* **9**, 67–73 (2013).
10. Kerbel, R. S. Tumor angiogenesis: Past, present and the near future. *Carcinogenesis* (2000). doi:10.1093/carcin/21.3.505
11. Roa, I. Conceptos Básicos Angiogénesis Tumoral. *Int. J. Med. Surg. Sci.* **1**, 129–138 (2014).
12. Yoo, S. Y. & Kwon, S. M. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. *Mediators Inflamm.* **2013**, 1–11 (2013).
13. Zimta, A. A., Baru, O., Badea, M., Buduru, S. D. & Berindan-Neagoe, I. The role of angiogenesis and pro-angiogenic exosomes in regenerative dentistry. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).

11. AUTOEVALUACIÓN

Personalmente, formar parte de este grupo de investigación ha sido una experiencia muy enriquecedora, he mejorado mis habilidades en el laboratorio, la confianza y seguridad en mí misma. He podido descubrir cómo funciona un grupo de investigación: cada uno centrado y motivado en su proyecto pero siempre en un ambiente común y abierto a nuevas aportaciones. Una continua formación es indispensable, es necesario seguir leyendo artículos y documentos para verificar y mejorar nuestro trabajo.

He aprendido a trabajar en condiciones de completa esterilidad con los cultivos celulares, he puesto en práctica conocimiento teóricos adquiridos durante la carrera y he aprendido nuevas técnicas, tanto para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, como de histología y biología molecular. También, he tenido la oportunidad de ver y aprender las técnicas y la correcta manipulación de los animales de experimentación para un mínimo daño posible.

En definitiva, me encontré involucrada en la rutina del laboratorio desde el primer día, todos los miembros del laboratorio, fueran de mi grupo o no, me acogieron como una más, hecho que hizo tener una actitud positiva para trabajar y seguir aprendiendo día a día.

12. ANEXOS

I. Protocolo EDU assay

Tras 24 horas de incubación con los fármacos:

1. Sacar 500µl de cada pozo.
2. Añadir 500µl/pozo de EdU (Componente A) y dejar incubando a 37°C durante 2 horas.
 - *Preparación Componente A: Añadir 2mL de DMSO (Componente C) a EdU (Componente A), mezclar solución.*
3. Realizar 2 lavados con PBS1x durante 5min en agitación
4. Fijar las células con PFA 4%, 400µL/pozo
5. Realizar 2 lavados con PBS1x durante 5min en agitación
6. Preparación del MIX: (seguir el orden estrictamente)
 - **Componente D (*Working solution 1X Click-it EdU reaction buffer*)**
Diluido 1:10 con H₂O MiliQ. Después de su uso, guardar la solución a 4°C
 - **Componente E (*CuSO₄*)**. Después de su uso, guardar la solución a 4°C
 - **Componente B (*Alexa Fluor azide*)**. Después de su uso, guardar la solución a 4°C.
 - *Preparación Componente B: Añadir 140µL de DMSO (Componente C) al Componente B, mezclar solución*
 - **Componente F (*10x stock solution of the Click-iT EdE buffer additive*)**. Diluido 1:10 con H₂O MiliQ. Después de su uso, guardar la solución a -20°C
 - *Preparación Componente F: Añadir 2mL de agua desionizada al Componente F, mezclar solución*
7. Añadir 100µL/pozo de la MIX. Proteger de la luz. Incubar durante 30min a temperatura ambiente y en constante agitación.

8. Aspirar la MIX
9. Realizar 2 lavados con PBS1X durante 5min en agitación
10. Añadir 100µl/pozo de DAPI. Diluido 1:3000. Dejar incubar 10 min a temperatura ambiente, protegido de la luz y en agitación constante.
11. Realizar 2 lavados con PBS1X durante 5min en agitación

Table 3. Click-iT® reaction cocktails.

Reaction components*	Number of coverslips						
	1	2	4	5	10	25	50
1X Click-iT® reaction buffer (prepared in step 1.4)	430 µL	860 µL	1.8 mL	2.2 mL	4.3 mL	10.7 mL	21.4 mL
CuSO ₄ (Component E)	20 µL	40 µL	80 µL	100 µL	200 µL	500 µL	1 mL
Alexa Fluor® azide (prepared in step 1.3)	1.2 µL	2.5 µL	5 µL	6 µL	12.5 µL	31 µL	62 µL
Reaction buffer additive (prepared in step 4.1)	50 µL	100 µL	200 µL	250 µL	500 µL	1.25 mL	2.5 mL
Total volume	500 µL	1 mL	2 mL	2.5 mL	5 mL	12.5 mL	25 mL

***Note:** Add the ingredients in the order listed in the table.

II. Protocolo ELISA

PREPARACIÓN DE LA PLACA

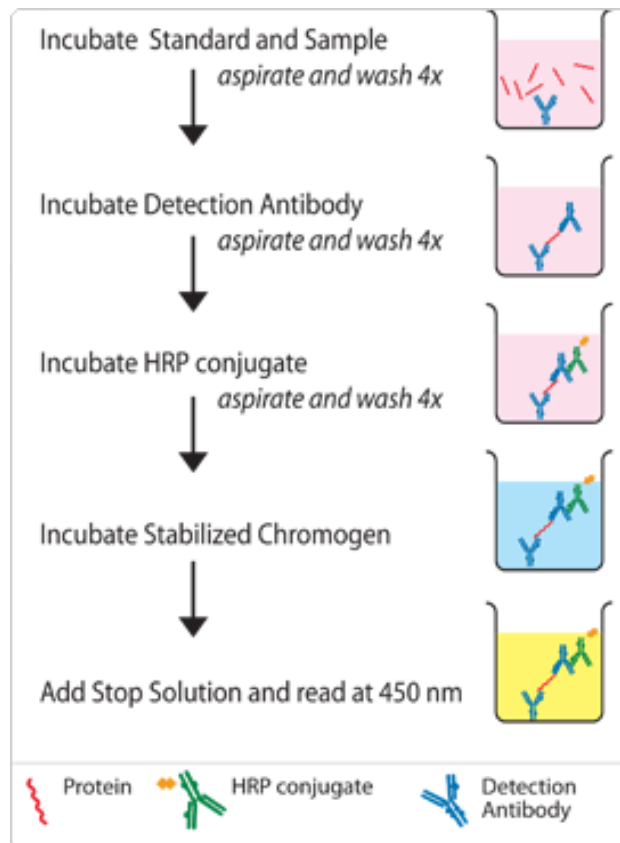
1. Añadir 100µL del “Anticuerpo de Captura”. Cubrir la placa y dejar incubar toda la noche a temperatura ambiente.
2. Aspirar y lavar la placa 3 veces con la solución de “Wash Buffer” 400µL/pozo.
3. Bloquear la placa con 300µL/pozo de Reagent Diluent. Cubrir la placa e incubar mínimo 1 hora a temperatura ambiente.
4. Aspirar y lavar la placa 3 veces con la solución de “Wash Buffer”

PROCIMIENTO DEL ENSAYO

Sacar a temperatura ambiente todos los reactivos antes de usar. Mezclar suavemente todos los reactivos líquidos antes de usar.

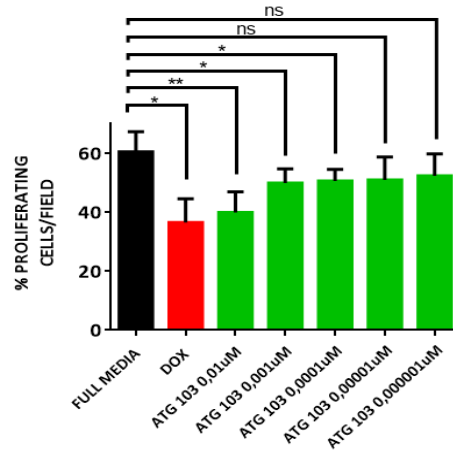
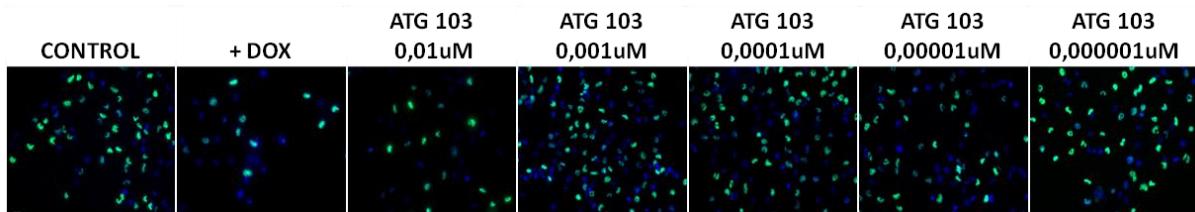
1. Añadir 100 µL de estándar preparado y de las muestras en los pozos. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas.
2. Aspirar o decantar completamente la solución de los pocillos.
3. Lavar los pocillos 4 veces con la solución de “Wash Buffer” 400µL/pozo.
4. Añadir 100 µL de anticuerpo de detección diluido a los pozos. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas.
5. Aspirar o decantar completamente la solución de los pocillos.
6. Lavar los pocillos 4 veces con la solución de “Wash Buffer” 400µL/pozo.
7. Agregue 100 µL de conjugado HRP diluido a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
8. Aspirar o decantar completamente la solución de los pocillos.
9. Lavar los pocillos 4 veces con la solución de “Wash Buffer” 400µL/pozo.
10. Añadir 100 µL de sustrato cromogénico a cada pozo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
11. Añadir 50 µL de solución de parada a cada pozo. La solución en los pozos debe cambiar de azul a amarillo.

12. La placa debe evaluarse dentro de los 30 minutos posteriores a la interrupción de la reacción. Lea la absorbancia de cada pozo a 450 nm
13. Utilice el software estadístico de ajuste de curvas para trazar una curva logística de cuatro parámetros que se ajuste a los estándares y luego calcule los resultados de las muestras de prueba.

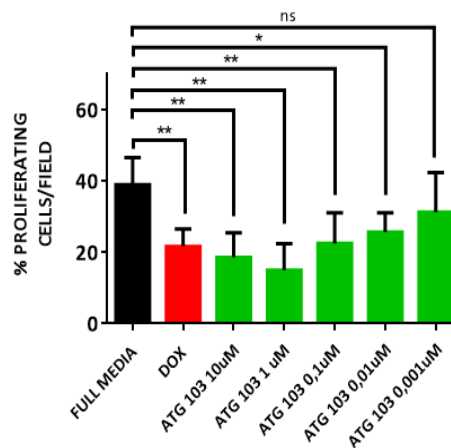
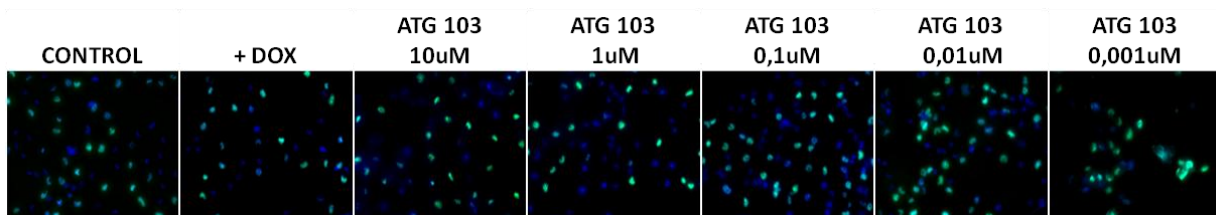


III. Ensayos de proliferación in vitro HIT 103 786-O sh91

EXP 1

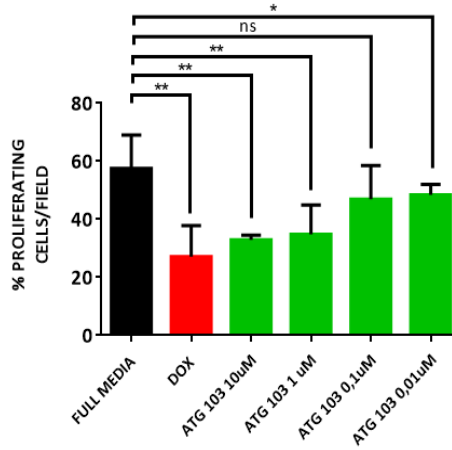
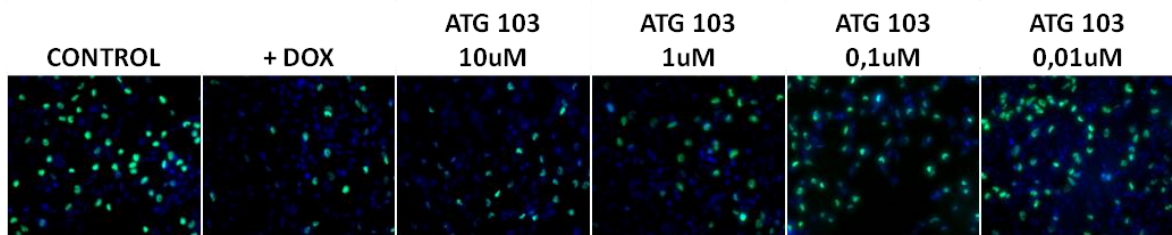


EXP 2

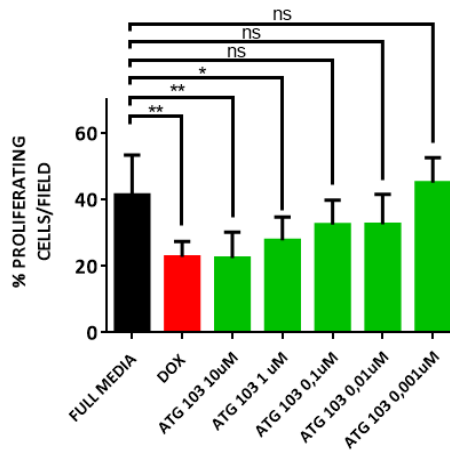
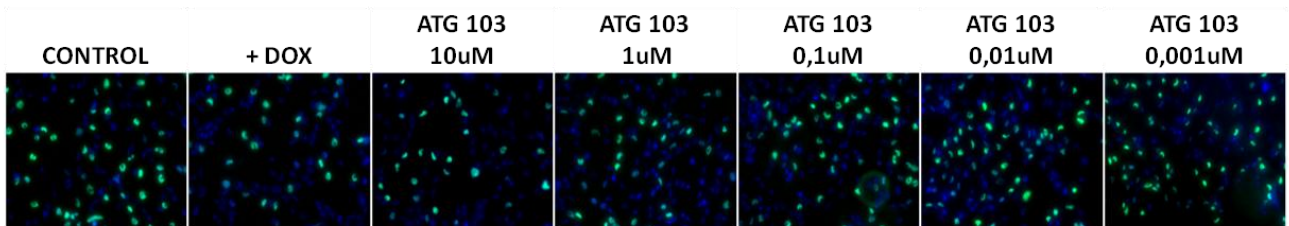




EXP 3

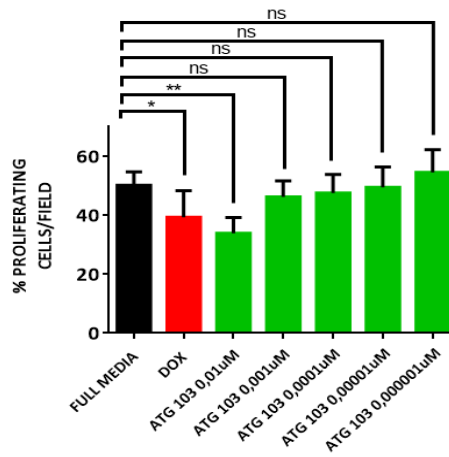
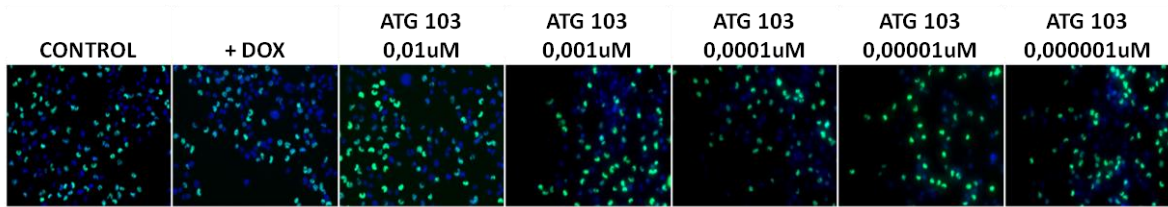


EXP 4

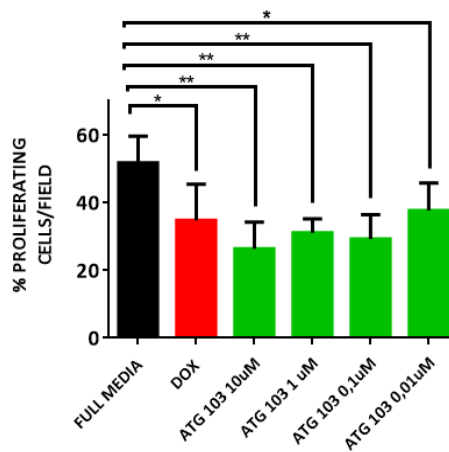
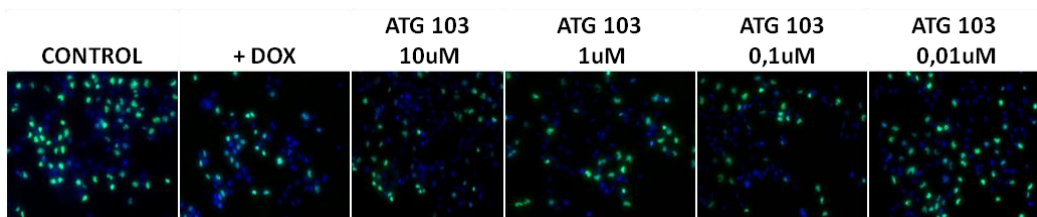


IV. Ensayos de proliferación in vitro HIT 103 SN12C sh91

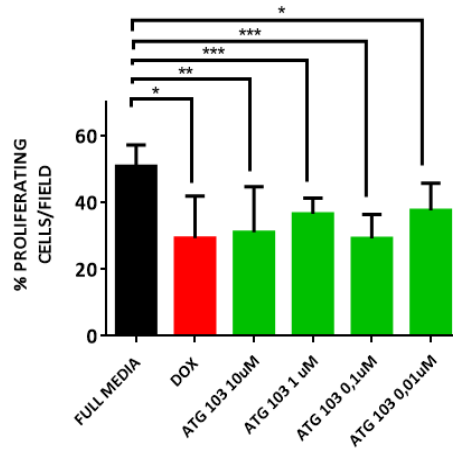
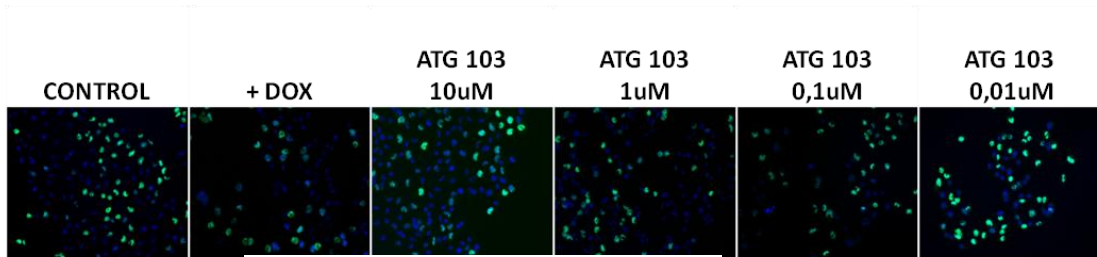
EXP 1



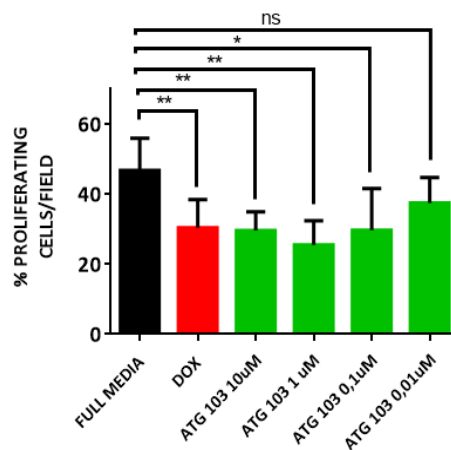
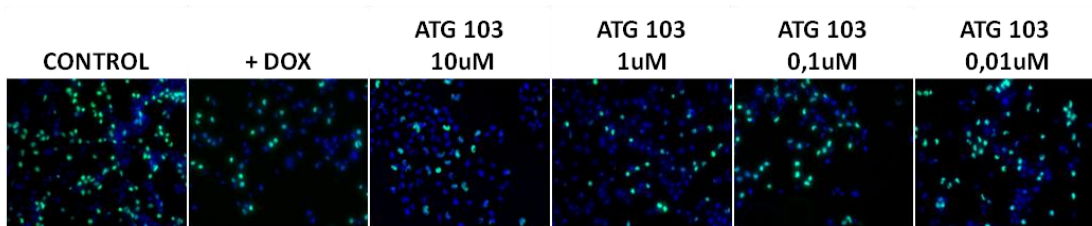
EXP 2



EXP 3

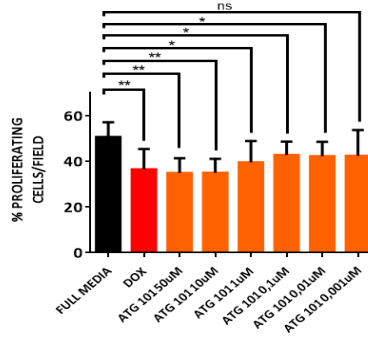
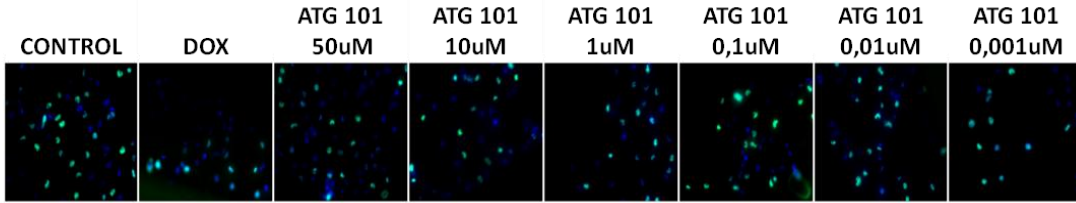


EXP 4

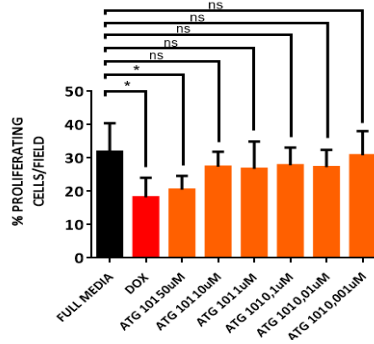
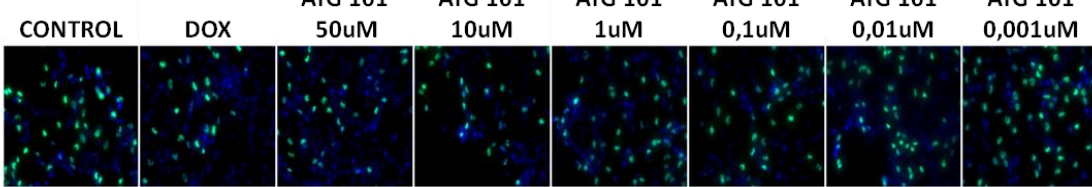


V. Ensayos de proliferación in vitro HIT 101 786-O sh91

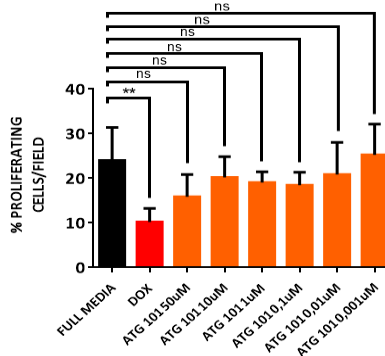
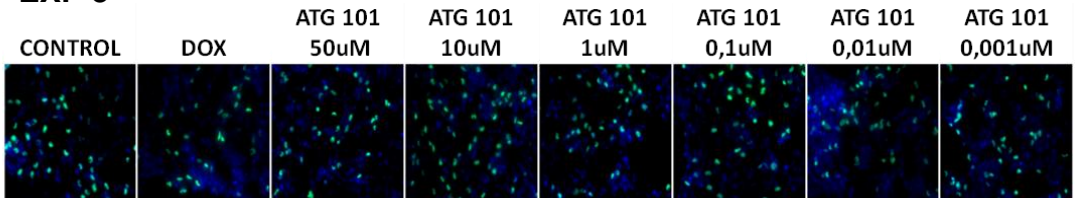
EXP 1



EXP 2

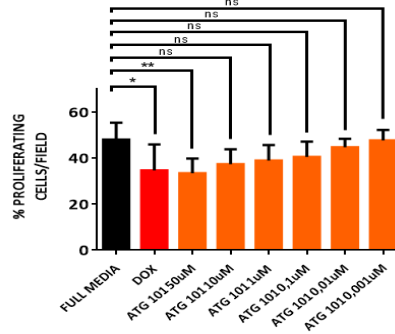
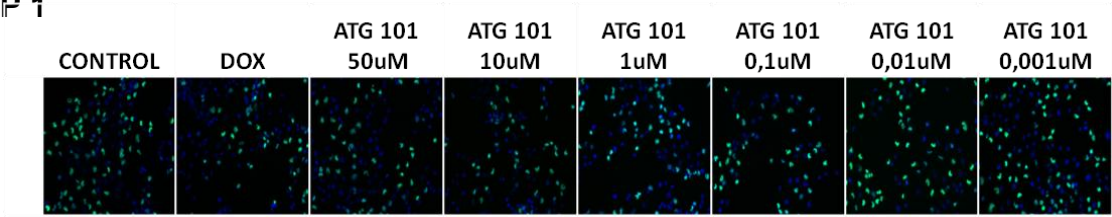


EXP 3

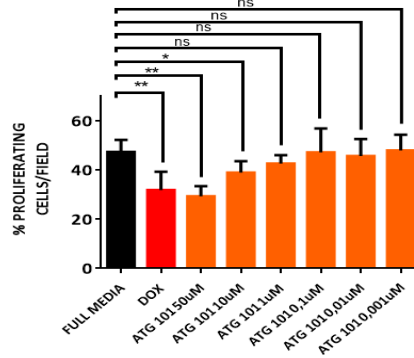
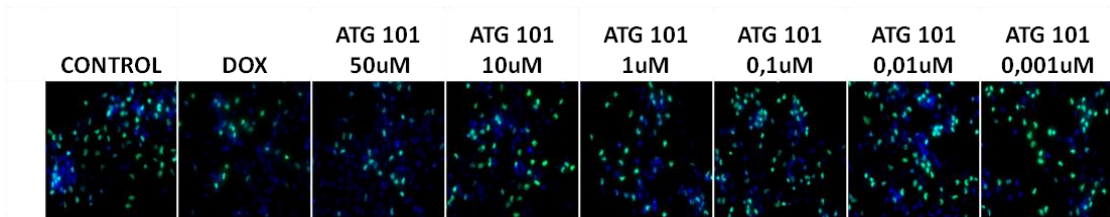


VI. Ensayos de proliferación in vitro HIT 101 SN12C sh91

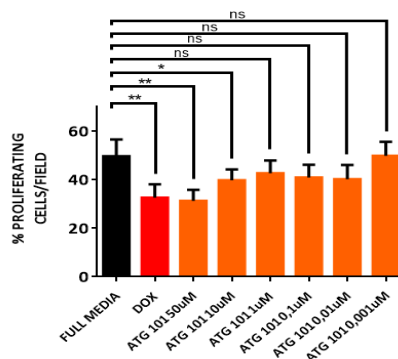
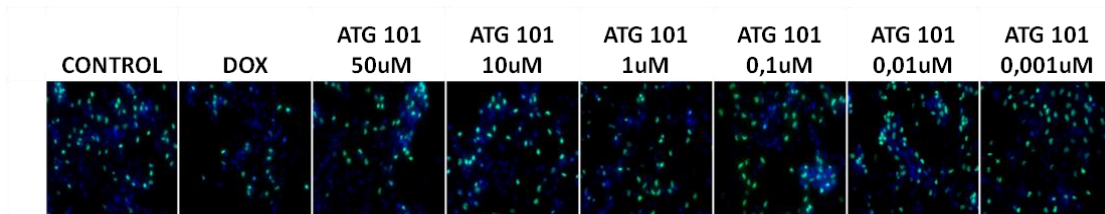
EXP 1



EXP 2

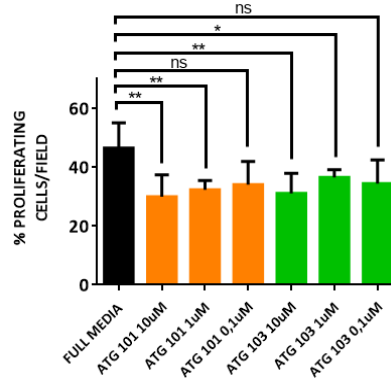
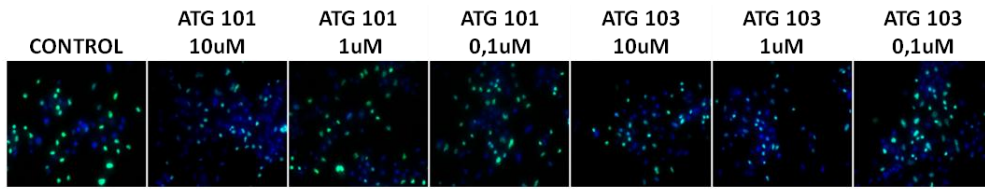


EXP 3

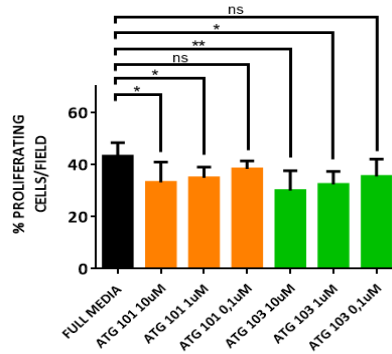
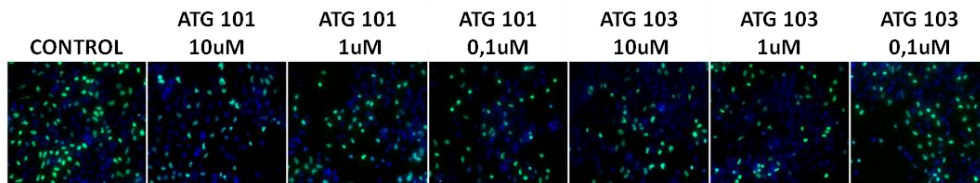


VII. Ensayos de proliferación in vitro HIT 101 Y 103 MiaPaca-2

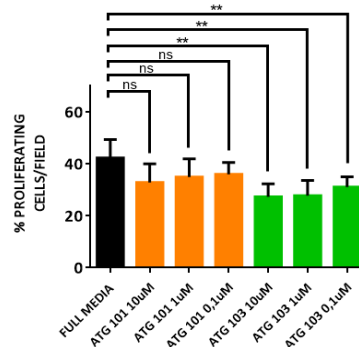
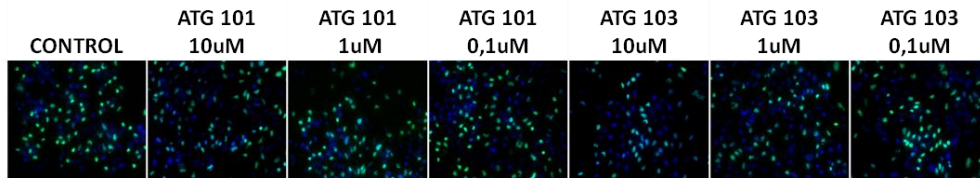
EXP 1



EXP 2

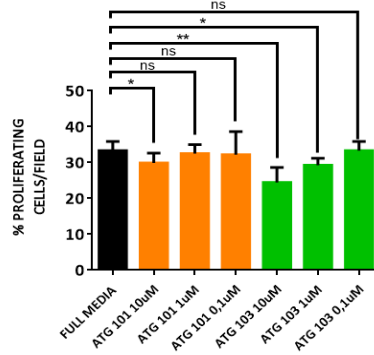
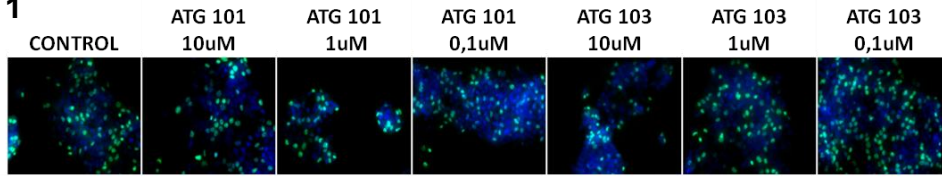


EXP 3

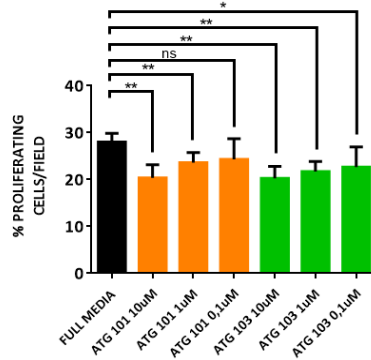
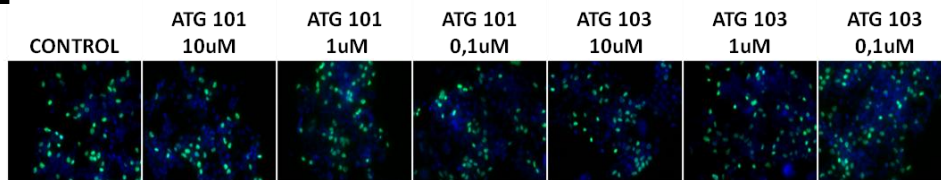


VIII. Ensayos de proliferación in vitro HIT 101 Y 103 NCI-H1573

EXP 1



EXP 2



EXP 3

