

INFORME DE CONCLUSIÓN DEL SERVICIO SOCIAL

Alumno: Delgado Sosa Paulina Areli

Matricula: 2173082198

Lugar de realización: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Periodo de realización: 18 de julio del 2022 al 18 de enero del 2023

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas, Lic. en Química Farmacéutica Biológica

Nombre del proyecto de investigación: Evaluación de los mecanismos que favorecen la muerte celular en el modelo de glioma con línea celular C6 in vitro e in vivo y células tumorales de pacientes in vitro, utilizando tratamiento con celecoxib, cloroquina y un compuesto de coordinación de cobre junto a tratamiento convencional con temozolomida.

Asesor interno: Mtro. Felipe Mendoza Solís

Asesor externo: Dr. Cristina Trejo Solís

Introducción

Los tumores cerebrales malignos son poco frecuentes y representan aproximadamente el 2% de todos los cánceres en adultos, donde el tumor con mayor porcentaje es el glioblastoma (GBM). La mayor proporción de tumores en adultos son supratentoriales, surgiendo en los lóbulos frontal, temporal y parietales, la mayoría (86%) son gliomas que incluyen astrocitomas, glioblastomas y oligodendrogliomas (Mckinney & Brain, 2004).

La resistencia del GBM a diversas terapias se debe a un genoma altamente mutado; estos cambios genéticos y sobreactivación de los receptores de tirosin-cinasa, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), que se encuentran regulados al alza en el GBM, dando lugar a mayores tasas de proliferación celular, angiogénesis e invasión (Katz et al, 2012; Sjostrom et al, 2011). Un ejemplo de la resistencia del GBM es la quimiorresistencia que incluye resistencia congénita y adquirida, y la quimiorresistencia adquirida es más grave (Yin et al, 2021)

Algunos estudios muestran que la ciclooxigenasa-2 (COX-2) se encuentra sobre expresada en varios tipos de cáncer como colorrectal, pulmón, mama, vejiga, hígado, tumores cerebrales y riñón (Fosslien, 2000; Hwang et al, 1998). La expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) se ha relacionado con el pronóstico, la angiogénesis y la sensibilidad a la radiación de muchas neoplasias malignas. Joki et al. (2000) informaron que el tratamiento con un inhibidor de la COX-2, NS-398, redujo la migración y proliferación de células tumorales y aumentó la apoptosis en ratones portadores de xenoinjertos de líneas celulares de glioma U-87MG y U-251MG.

Existen algunos estudios preclínicos que demuestran que el uso de cloroquina, casiopeina, celecoxib y en combinación de este con la temozolomida, inducen la muerte celular por apoptosis. Por esta razón, el objetivo de esta investigación es determinar los posibles mecanismos moleculares por los cuales estos fármacos pueden ejercer muerte celular en células de glioma C6 y humano

Objetivo general

- Determinar los posibles mecanismos moleculares por los cuales el celecoxib, la cloroquina y la casiopeina pueden inducir muerte celular en células de glioma C6 y humano

Objetivos específicos

- Determinar la presencia de COX-2 en la línea celular de glioma C6 de rata y en células de glioma humano.
- Valorar el efecto de celecoxib, cloroquina, y casiopeina sobre la proliferación celular en el glioma C6 de rata *in vitro* y en células de glioma humano.
- Valorar el efecto de celecoxib sobre la proliferación celular en el glioma C6 de rata *in vivo*.
- Valorar el efecto de celecoxib, cloroquina, y casiopeina sobre la proliferación celular en el glioma C6 de rata *in vitro* y en células de glioma humano junto con el tratamiento convencional (temozolomida).

Metodología utilizada

Purificación de celecoxib

Se adquirió el celebrex (celecoxib) comercialmente en presentación de cápsulas de 200 mg, se obtuvo el polvo blanco de la cápsula, se agitó con cloroformo (CHCl_3) durante una hora, se separó por filtración, se obtuvieron dos porciones, una fracción sólida, que es vehículo, esta porción fue descartada, y la solución clorofórmica que contiene el celecoxib, se evaporó por un sistema de rotavapor a 60°C , donde se obtuvo el celecoxib, el compuesto que se obtuvo se sometió a resonancia magnética nuclear protones ^1H , mediante los desplazamientos químicos y multiplicidad de la señal se analizó dicho compuesto.

Cultivo y control en el crecimiento de células C6

Se utilizó la línea celular C6 de glioma de rata obtenida de American Tissue Culture Collection (ATCC). Se cultivó en un medio Dulbecco Modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% y mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

Posteriormente, se verificó el crecimiento de las células C6 en las cajas de cultivo; se observó un medio de cultivo color naranja-amarillento, quiere decir que el pH se volvió ácido, los nutrientes en él disminuyeron y subieron productos de desecho, es por esto por lo que se necesitó cambiar el medio realizando un lavado.

Lavado de células C6

El medio fue desechado en un vaso de precipitado, las células fueron lavadas con 5 mL de solución salina más antibiótico, el vaciado de esta en la caja se debe realizar en la parte donde no se encuentre la monocapa de células, mediante movimientos lentos de la solución preparada para posteriormente vaciarlo en el vaso de desechos; el procedimiento se realizó por duplicado. Después de los lavados se procedió a añadir 10 mL de medio de cultivo y se incubó.

Tripsinización

Se realizaron dos lavados con solución salina a la caja de cultivo, para desprender las células se utilizaron 2 mL de tripsina a temperatura ambiente, se realizan movimientos sobre la monocapa observando cómo se fueron desprendiendo, un vez desprendidas se tomaron las células con una pipeta y se colocaron en un tubo Falcón de 15 mL con medio de cultivo con la finalidad de desactivar la tripsina, los mililitros que se usaron serán los mismos que se usó de tripsina, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos.

Conteo en cámara de Neubauer

Las células se centrifugaron, se decantó y se disolvió el pellet con 2 mL de medio de cultivo, se tomó una alícuota de 10 μL de células colocándolo en un vial con 90 μL de medio (dilución 1:10), se tomó 10 μL de esta dilución y se colocó en la cámara de Neubauer. Para el conteo de células se tomaron en cuenta las que tenían forma redondeada con borde regular y brillantes, la suma total se dividió entre 4 (número de cuadrantes) y ese resultado entre 10 (factor de dilución) para obtener el número total de células $\times 10^6$.

Cálculos

Para saber cuántas células se van a sembrar en cajas de 96 pozos se realizó la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Densidad utilizada por pozo})(1000 \mu\text{L})}{\text{Total de células}} = \text{número de células requeridas}$$

Siembra de células en la caja de 96 pozos

Para cada pozo se colocaron 100 μL de medio de cultivo más el número de células requeridas, todos los pozos se van a resuspender para evitar la formación de grumos y que la monocapa se forme parejo, después de ello se llevó a incubar y se monitoreo su crecimiento.

Tratamiento con el fármaco celecoxib en células C6

Se preparó un stock del fármaco disolviendo 28 mg de celecoxib en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se esterilizó por el método de filtración, se tomó una alícuota de 21.43 μL , 32.14 μL , 42.83 μL más 2 mL de medio de cultivo sin suero fetal bovino, estas soluciones tienen las concentraciones de 50 μM , 75 μM y 100 μM respectivamente, las cuales se trataron a cuatro diferentes horas (3h, 6h, 12h y 24h), con la finalidad de hacer una comparación y observar el efecto del fármaco vs tiempo. El tratamiento con el fármaco celecoxib se realizó por triplicado.

Ensayo de MTT

Este ensayo se utilizó para ver la viabilidad celular a través del cambio de color, donde primero se añade 10 μl de la solución del MTT se deja reposar por tres horas y posteriormente se agregan 100 μl de solución solubilizadora y se espera por 24 horas, el ensayo se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda 550 nm, se evaluará la densidad óptica de las células no tratadas con las tratadas.

Actividades realizadas

Cultivo y control en el crecimiento de células C6

Lavado de células C6

Tripsinización de células C6

Conteo de células en cámara de Neubauer

Siembra de células en la caja de siembra de 96 pozos

Tratamiento en células C6 con el fármaco celecoxib

Ensayo de MTT

Elaboración de soluciones para los experimentos

Elaboración de gel de acrilamida

Para otros proyectos se realizó:

Electroforesis

Western blot

Lisis celular

Metas alcanzadas

Para el proyecto solo se logró realizar el tratamiento y análisis de las células C6 con el fármaco celecoxib, ya que es un proyecto que tiene una meta a largo plazo por los estudios *in vitro* e *in vivo* que se tienen que realizar con cada fármaco y una combinación con temozolomida.

Resultados

El tratamiento de celecoxib a diferentes horas (3,6,12 y 24) con tres concentraciones distintas ($50\mu\text{M}$, $75\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$) proporciono los siguientes resultados cualitativos bajo el microscopio, los porcentajes presentados en cada una de las imágenes fueron descritos visualmente. Las imágenes 1,5,9 y 13 son células C6 sin tratamiento y fueron utilizadas como controles.

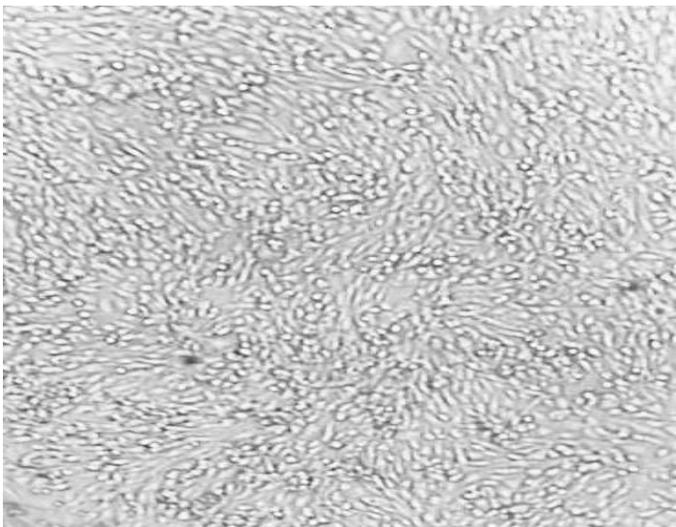


Imagen 1. Control a 3 horas. Después del tratamiento de celecoxib a las células C6 a las tres horas tenemos nuestro control con un 100% de células vivas.

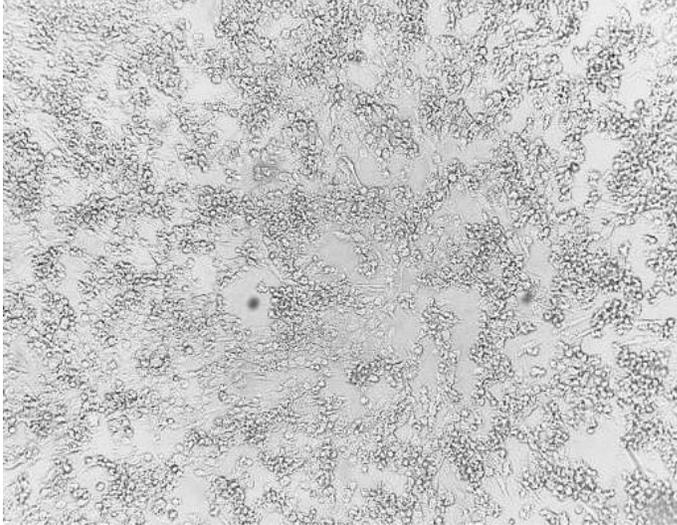


Imagen 2. Tratamiento a 3 horas con una concentración de celecoxib a 50 μM . Se observa un 80% de células vivas y 20% de células muertas.

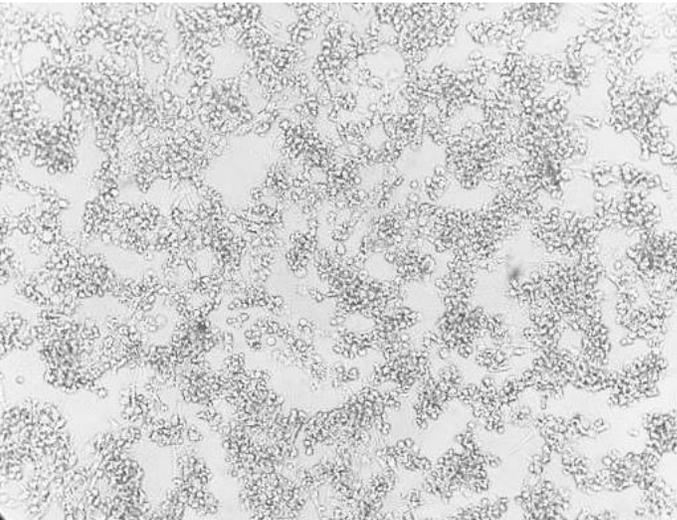


Imagen 3. Tratamiento a 3 horas con una concentración de celecoxib a 75 μM . Se observa un 70% de células vivas y 30% de células muertas.

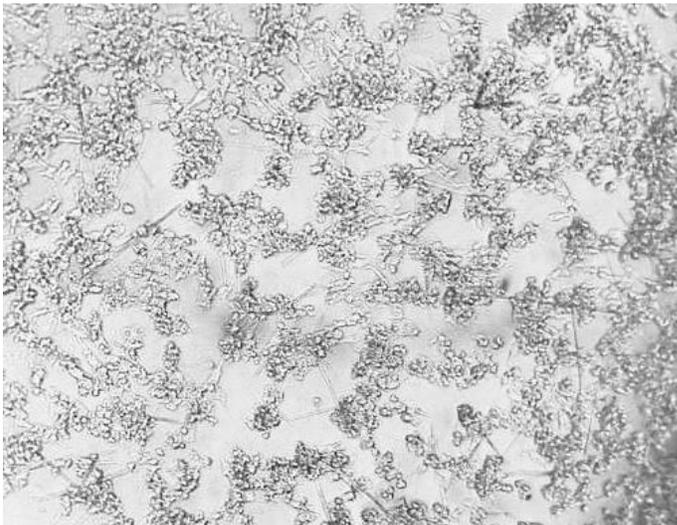


Imagen 4. Tratamiento a 3 horas con una concentración de 100 μM . Se observa un 60% de células vivas y 40% de células muertas.

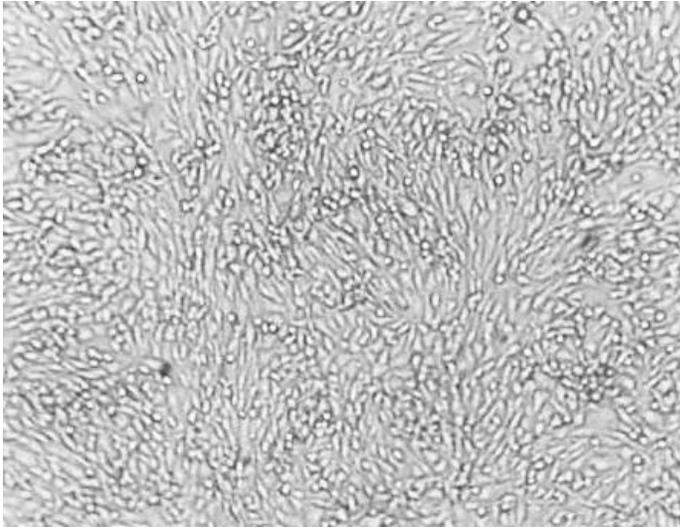


Imagen 5. Control a 6 horas. Después del tratamiento de celecoxib a las células C6 a las seis horas tenemos nuestro control con un 100% de células vivas.

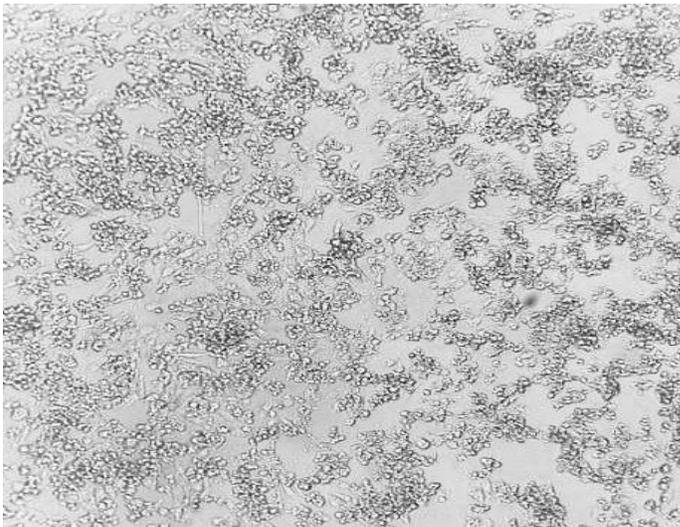


Imagen 6. Tratamiento a 6 horas con una concentración de celecoxib a 50 μM . Se observa un 60% de células vivas y 40% de células muertas.

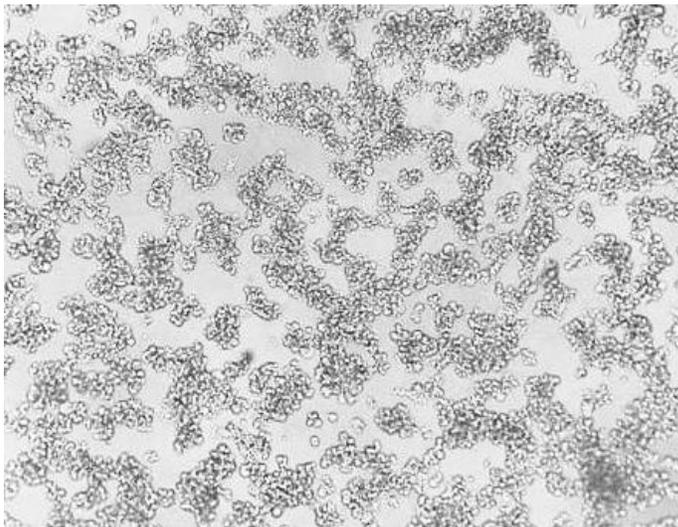


Imagen 7. Tratamiento a 6 horas con una concentración de celecoxib a 75 μM . Se observa un 30% de células vivas y 70% de células muertas.

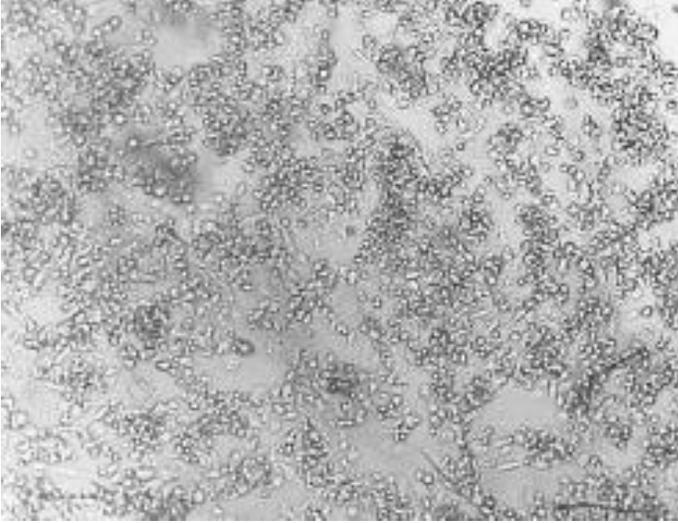


Imagen 8. Tratamiento a 6 horas con una concentración de celecoxib a 100 μM . Se observa un 20% de células vivas y 80% de células muertas.

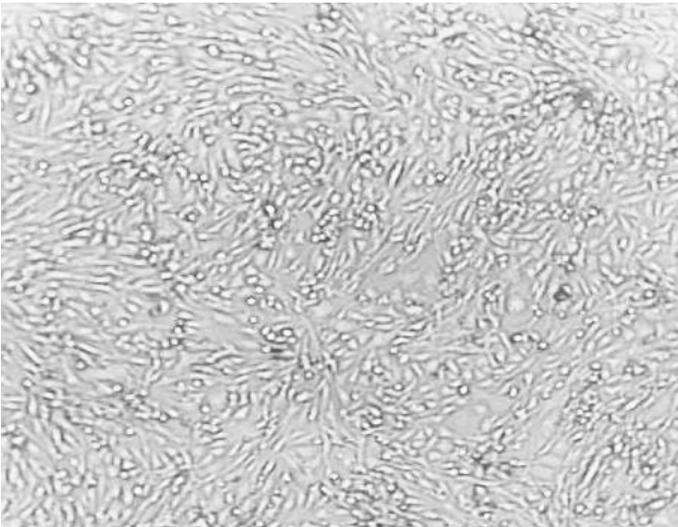


Imagen 9. Control a 12 horas. Después del tratamiento de celecoxib a las células C6 a las doce horas tenemos nuestro control con un 100% de células vivas.

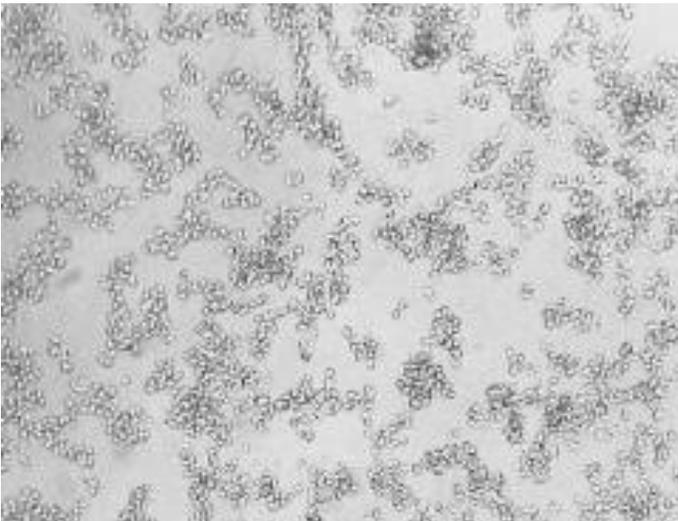


Imagen 10. Tratamiento a 12 horas con una concentración de celecoxib a 50 μM . Se observa un 40% de células vivas y 70% de células muertas.

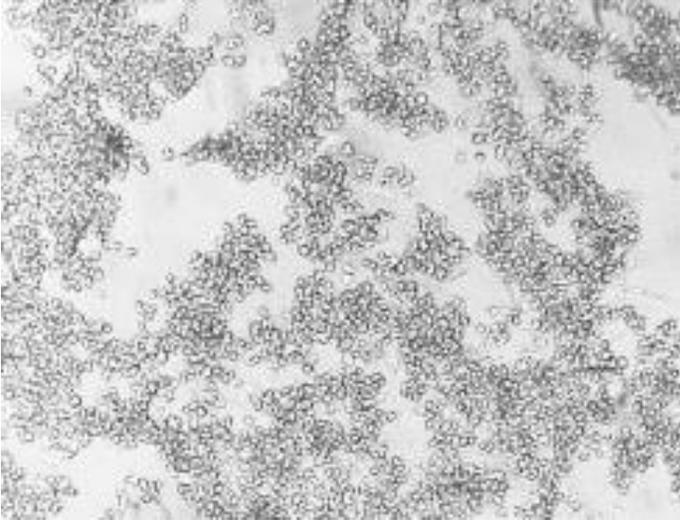


Imagen 11. Tratamiento a 12 horas con una concentración de celecoxib a 75 μM . Se observa un 30% de células vivas y 70% de células muertas.

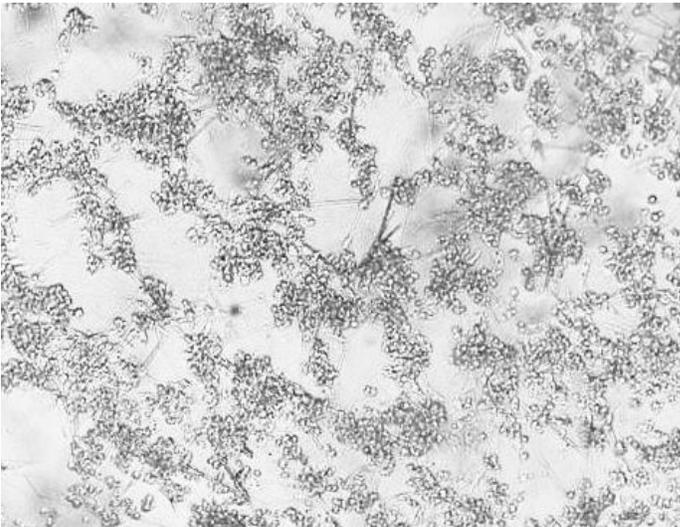


Imagen 12. Tratamiento a 12 horas con una concentración de celecoxib a 100 μM . Se observa un 20% de células vivas y 80% de células muertas.

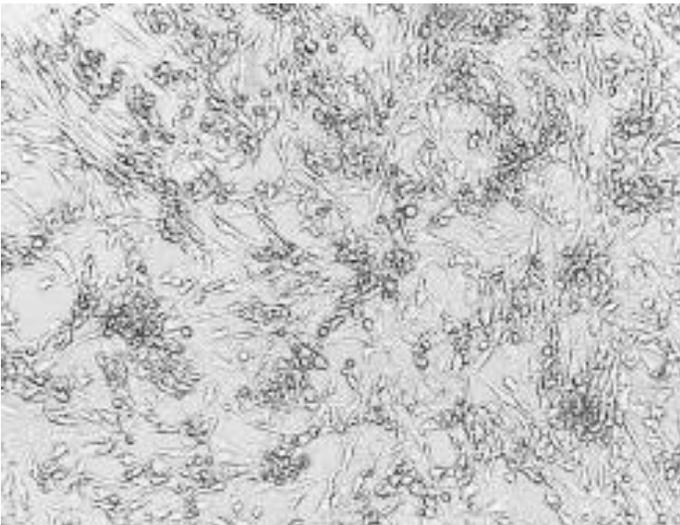


Imagen 13. Control a 24 horas. Después del tratamiento de celecoxib a las células C6 a las veinte y cuatro horas tenemos nuestro control con un 100% de células vivas.

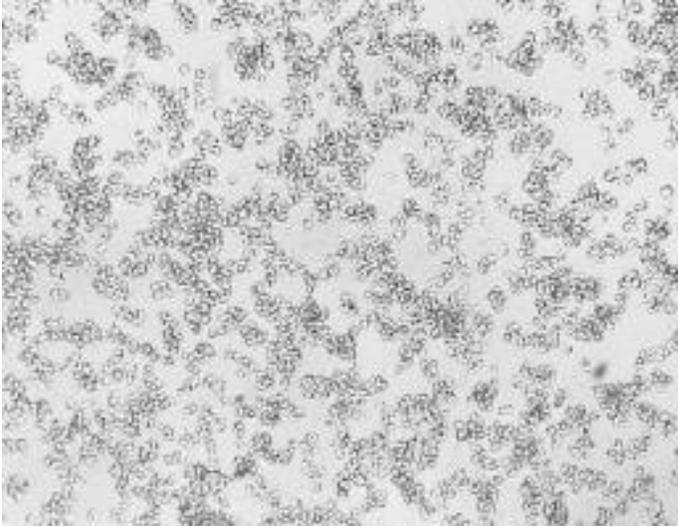


Imagen 14. Tratamiento a 24 horas con una concentración de celecoxib a 50 μM . Se observa un 20% de células vivas y 80% de células muertas.

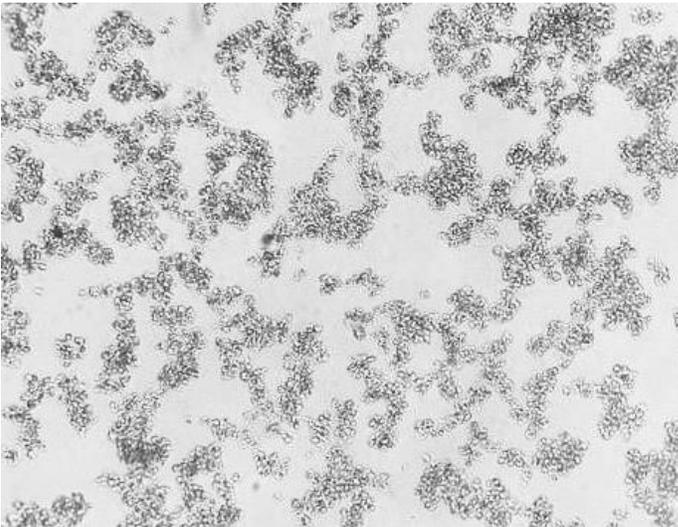


Imagen 15. Tratamiento a 24 horas con una concentración de celecoxib a 75 μM . Se observa un 10% de células vivas y 90% de células muertas.

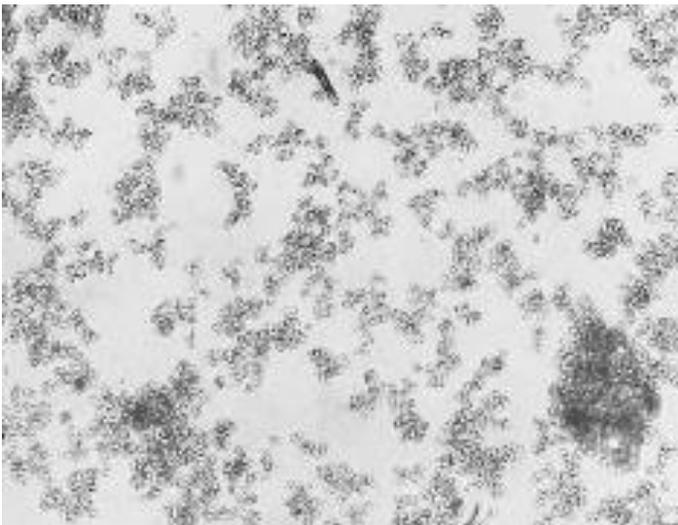


Imagen 16. Tratamiento a 24 horas con una concentración de celecoxib a 100 μM . Se observa ≈ 100 de células muertas.

El tratamiento a tres horas con las tres concentraciones, presento un menor número de células muertas (imágenes 2 a 4) al igual que las concentraciones de 50 μM en 6,12 y 24 horas (imágenes 6 y 10).

Las células analizadas presentaron un patrón perceptible en el cual se identificó que una mayor concentración acompañada de un tiempo más alto de tratamiento generó un número elevado de células muertas, esto se demostró en concentraciones de 75 μM y 100 μM de 6 a 24 horas, como se muestran en las imágenes 7,8,11,12,14,15 y 16.

Prueba de MTT

Una vez que el tratamiento termino se procedió a realizar la prueba de MTT, los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 1. Prueba 1 de MTT a 3 horas

						% Células muertas
Control	1.16	1.11	1.15	1.15	1.15	
50 μM	1.07	1.06	1.05	1.08	1.04	7.343
75 μM	0.98	0.94	0.99	0.97	0.96	15.385
100 μM	0.85	0.88	0.92	0.95	0.94	20.629

Se observo que la concentración donde hubo mayor porcentaje de células muertas fue a 100 μM .

Tabla 2. Prueba 1 de MTT a 6 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.11	1.15	1.15	1.15	
50 μM	0.87	0.88	0.84	0.85	0.86	24.825
75 μM	0.72	0.7	0.71	0.73	0.71	37.587
100 μM	0.56	0.54	0.53	0.51	0.52	53.497

Se observo que la concentración donde hubo mayor porcentaje de las células muertas fue a 100 μM , sin embargo, también se incrementó en concentraciones de 50 μM y 75 μM cuando se comparó con el de tres horas.

Tabla 3. Prueba 1 de MTT de 12 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.13	1.07	1.14	1.16	
50 μM	0.58	0.53	0.5	0.56	0.57	51.590106
75 μM	0.28	0.26	0.24	0.27	0.28	76.5017668
100 μM	0.19	0.17	0.16	0.18	0.18	84.4522968

Se observo que la concentración donde hubo mayor porcentaje de las células muertas fue a 100 μM , también se incrementó al doble en concentraciones de 50 μM y 75 μM cuando se comparó con el de seis horas.

Tabla 4. Prueba 1 de MTT de 24 horas

						% células muertas
Control	1.15	1.13	1.15	1.05	0.96	
50 μ M	0.32	0.26	0.29	0.26	0.24	74.8161765
75 μ M	0.22	0.16	0.19	0.15	0.11	84.7426471
100 μ M	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	95.0367647

Se observo que la concentración donde aproximadamente el 100% de las células muertas fue a 100 μ M, sin embargo, a concentraciones de 50 μ M y 75 μ M hubo porcentajes arriba de 70% en comparación a 12 horas que se observó solo en concentraciones de 75 μ M.

En estas tablas se comprueba que las células C6 con el tratamiento celecoxib tiene un porcentaje de muerte celular mayor a las 12 y 24 horas (tablas 3 y 4) con las concentraciones que van desde 75 μ M a 100 μ M en comparación de las horas 3 y 6 con una concentración de 50 μ M (tabla 1 y 2). Se muestran tres tablas de cada hora para confirmar que el fármaco utilizado tuvo el mismo efecto en las tres pruebas, así como la repetibilidad del ensayo, las tablas faltantes de la prueba dos y tres se encuentran en el anexo 1.

Conclusión

El celecoxib al ser un fármaco que puede inhibir la COX-2 que ayuda a reducir la migración, proliferación de células tumorales y aumentar la apoptosis, en el experimento notamos que las células C6 sufrieron muerte celular a concentraciones de 75 y 100 μ M con un tiempo mayor a 6 horas, sin embargo, la eficacia del celecoxib como tratamiento aún no se ha establecido de manera concluyente y su uso en este contexto todavía es experimental como en esta investigación. Se necesitan más investigaciones y ensayos clínicos para evaluar la seguridad, dosis optimas y duración del tratamiento.

Recomendaciones

Es importante observar el crecimiento de las células ya que, si existe un sobrecrecimiento estas tienden a desprenderse y por lo tanto hay que esperar más días para que se desarrollen.

Al realizar cualquier experimento se tiene que trabajar cuidadosamente y con precaución para evitar contaminaciones de los cultivos.

Todas las soluciones por emplear deben estar a temperatura ambiente o igual a la temperatura de las células.

Esperar los tiempos adecuados de cada prueba para evitar falsos positivos.

Es importante que la pipeta que se utiliza nunca toque la orilla de la caja de cultivo, por eso al realizar el vaciado se recomienda hacerlo 1-2 cm arriba de la orilla.

Referencias bibliográficas

Fosslien, E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2000, 30, 3–21.

Hwang, D.; Scollard, D.; Byrne, J.; Levine, E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998, 90, 455–460, doi:10.1093/jnci/90.6.455.

Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, Black PM. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and *in vitro* inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res.* 2000; 60:4926–31.

Katz, A.M.; Amankulor, N.M.; Pitter, K.; Helmy, K.; Squatrito, M.; Holland, E.C. Astrocyte-specific expression patterns associated with the PDGF-induced glioma microenvironment. *PLoS One* 2012, 7, doi:10.1371/journal.pone.0032453.

McKinney, P.A. Brain tumours: Incidence, survival, and aetiology. *Neurol. Pract.* 2004, 75, 12–17, doi:10.1136/jnnp.2004.040741.

Sjöström, S.; Wibom, C.; Andersson, U.; Brännström, T.; Broholm, H.; Johansen, C.; Collatz-Laier, H.; Liu, Y.; Bondy, M.; Henriksson, R.; et al. Genetic variations in VEGF and VEGFR2 and glioblastoma outcome. *J. Neurooncol.* 2011, 104, 523–527, doi:10.1007/s11060-010-0504-2.

Yin D, Jin G, He H, Zhou W, Fan Z, Gong C, Zhao J, Xiong H. Celecoxib reverses the glioblastoma chemo-resistance to temozolomide through mitochondrial metabolism. *Aging (Albany NY)*. 2021 Sep 8;13(17):21268-21282. doi: 10.18632/aging.203443. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34497154; PMCID: PMC8457578.

Anexo 1. Tablas del ensayo MTT de la prueba dos y tres

Tabla 5. Prueba 2 de MTT a 3 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.11	1.15	1.15	1.15	
50 μ M	1.06	1.08	1.04	1.08	1.03	7.517
75 μ M	0.97	0.92	0.96	0.99	0.99	15.559
100 μ M	0.83	0.89	0.94	0.93	0.96	20.455

Tabla 6. Prueba 2 de MTT a 6 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.11	1.15	1.15	1.15	
50 μ M	0.84	0.92	0.86	0.83	0.86	24.650
75 μ M	0.73	0.71	0.69	0.74	0.68	37.937
100 μ M	0.53	0.55	0.54	0.53	0.5	53.671

Tabla 7. Prueba 2 de MTT a 12 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.13	1.07	1.14	1.16	
50 μ M	0.57	0.52	0.49	0.56	0.57	52.1201413
75 μ M	0.29	0.26	0.24	0.27	0.3	75.9717314
100 μ M	0.2	0.17	0.16	0.18	0.19	84.0989399

Tabla 8. Prueba 2 de MTT a 24 horas

						% células muertas
Control	1.15	1.13	1.15	1.05	0.96	
50 μ M	0.31	0.26	0.29	0.25	0.24	75.1838235
75 μ M	0.22	0.16	0.19	0.15	0.14	84.1911765
100 μ M	0.07	0.05	0.05	0.05	0.04	95.2205882

Tabla 9. Prueba 3 de MTT a 3 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.11	1.15	1.15	1.15	
50 μ M	1.09	1.07	1.02	1.05	1.05	7.692
75 μ M	0.98	0.95	0.96	0.99	0.93	15.909
100 μ M	0.84	0.86	0.95	0.91	0.98	20.629

Tabla 10. Prueba 3 de MTT a 6 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.11	1.15	1.15	1.15	
50 μ M	0.88	0.89	0.82	0.86	0.85	24.825
75 μ M	0.7	0.73	0.72	0.71	0.7	37.762
100 μ M	0.58	0.53	0.51	0.52	0.54	53.147

Tabla 11. Prueba 3 de MTT a 12 horas

						% células muertas
Control	1.16	1.13	1.07	1.14	1.16	
50 μ M	0.57	0.52	0.5	0.56	0.57	51.943463
75 μ M	0.29	0.26	0.24	0.27	0.32	75.618375
100 μ M	0.21	0.17	0.16	0.18	0.19	83.922261

Tabla 12. Prueba 3 de MTT a 24 horas

						% células muertas
Control	1.15	1.13	1.15	1.05	0.96	
50 μ M	0.33	0.27	0.28	0.25	0.22	75.183824
75 μ M	0.2	0.16	0.19	0.15	0.14	84.558824
100 μ M	0.05	0.05	0.06	0.04	0.04	95.588235