

## Efecto antitumoral de la combinación de selenito con quimioterapia y radioterapia en líneas celulares de glioblastoma multiforme

Cristina Mesas<sup>1</sup>, Kevin Doello<sup>2</sup>, Gloria Perazzoli<sup>1,3</sup>, Laura Cabeza<sup>1</sup>, Raúl Ortíz<sup>1</sup>

1. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada, España.

2. Servicio de Oncología Médica, Hospital Virgen de las Nieves, Granada

3. Universidad de Almería (UAL).

Autor de correspondencia: Cristina Mesas

Correo electrónico: cristinam@ugr.es

### Introducción

El glioblastoma multiforme (GBM) es un tumor maligno del sistema nervioso central en adultos que surge de las células gliales (astrocitos y oligodendrocitos). Su pronóstico es nefasto, ya que tras el diagnóstico la supervivencia media oscila entre los 12 y 15 meses con tratamiento. La tasa de incidencia promedio (IR) de GBM es 3,19 por cada 100,000 habitantes y la edad mediana de diagnóstico es de 64 años. La incidencia es mayor en hombres e individuos de raza blanca y etnia no hispana. El Instituto Nacional del Cáncer estima que 22.550 adultos (12.630 hombres y 10.280 mujeres) fueron diagnosticados con cáncer cerebral y otro cáncer del sistema nervioso en 2015. También estima que en 2015, 15.320 de estos diagnósticos resultaron en la muerte. La GBM tiene una incidencia de dos a tres por cada 100.000 adultos al año, y representa el 52 por ciento de todos los tumores cerebrales primarios. En general, GBM representa alrededor del 17 por ciento de todos los tumores del cerebro (primarios y metastásicos). Estos tumores tienden a ocurrir en adultos entre las edades de 45 y 70 años. Entre 2005 y 2009, la edad media para la muerte por cáncer del cerebro y otras áreas del sistema nervioso central fue de 64

años.

El tratamiento del mismo se basa en tres pilares: la cirugía, la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT). Ésta última se encuentra muy limitada ya que únicamente pueden utilizarse agentes que atraviesen la barrera hematoencefálica (BHE). El agente más utilizado es la temozolamida (TMZ), un alquilante que se activa intracelularmente. Sin embargo, un elevado porcentaje de las células en los glioblastomas son resistentes a la TMZ, ya que expresan la proteína MGMT (O6-metilguanina-metiltransferasa), que repara los daños por alquilación inducidos por la TMZ. Esto explica que la TMZ fracase en los glioblastomas y que el desenlace sea, finalmente, fatal.

### Materiales y Métodos

#### Cultivo celular

Células de las líneas A549 (adenocarcinoma pulmonar), SF268 (glioblastoma multiforme, resistentes a TMZ por expresión de MGMT), A172 (glioblastoma multiforme, no resistentes a TMZ), LN229 (glioblastoma multiforme, no resistentes a TMZ), fueron sembradas en placas de 24 pocillos, a 8000 células por pocillo y cultivadas con 400 µl de DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium) suplementado con suero bovino fetal (FBS)

al 10% y ATB (antibiótico, estreptomina + anfotericina B) al 1%.

### **Estudio de viabilidad celular**

Se estudió el efecto citotóxico y antitumoral del selenito sódico frente a las líneas descritas previamente. Además, se realizaron combinaciones con el quimioterápico temozolamida (TMZ) a diferentes concentraciones.

El efecto citotóxico de los reactivos sobre las líneas celulares fue determinado usando sulforrodamina B. Las células tumorales fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Tras 24 horas desde la siembra se añadieron los fármacos en los respectivos pocillos. En el caso de los ensayos con radioterapia, las células fueron sometidas a irradiación en las instalaciones del CIC usando un irradiador 137Cs. La radiación fue administrada para que las células fuesen radiadas durante 48 o 72 horas antes de la fijación. Se administraron dosis de 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy y 8 Gy. El ensayo, en todos los casos, duró 72 horas, tras lo cual las placas fueron fijadas con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 20 minutos. Después, las placas fueron lavadas con agua destilada 3 veces. Una vez secas, se tiñeron con sulforrodamina B, la cual se une a las proteínas básicas de membrana de las células que permanecen pegadas a los pocillos de la placa, es decir, las que estaban vivas en el ensayo. Se tiñeron durante 20 minutos, tras lo que se lavaron las placas con ácido acético al 1% tres veces. Se dejaron secar.

Una vez secas se añadió tris-base en los pocillos durante 20 minutos y luego se obtuvieron 100  $\mu$ L que fueron añadidos en una placa de 96 pocillos que fue leída con un espectrofotómetro y el software Ascent a 492nm. Se obtuvieron los valores de absorbancia para los distintos pocillos, obteniéndose, tras ello, los porcentajes de viabilidad para cada pocillo, las IC50 (concentración de fármaco a la que permanecen viables la mitad de células que existen en los controles para esa línea) y las

gráficas

correspondientes.

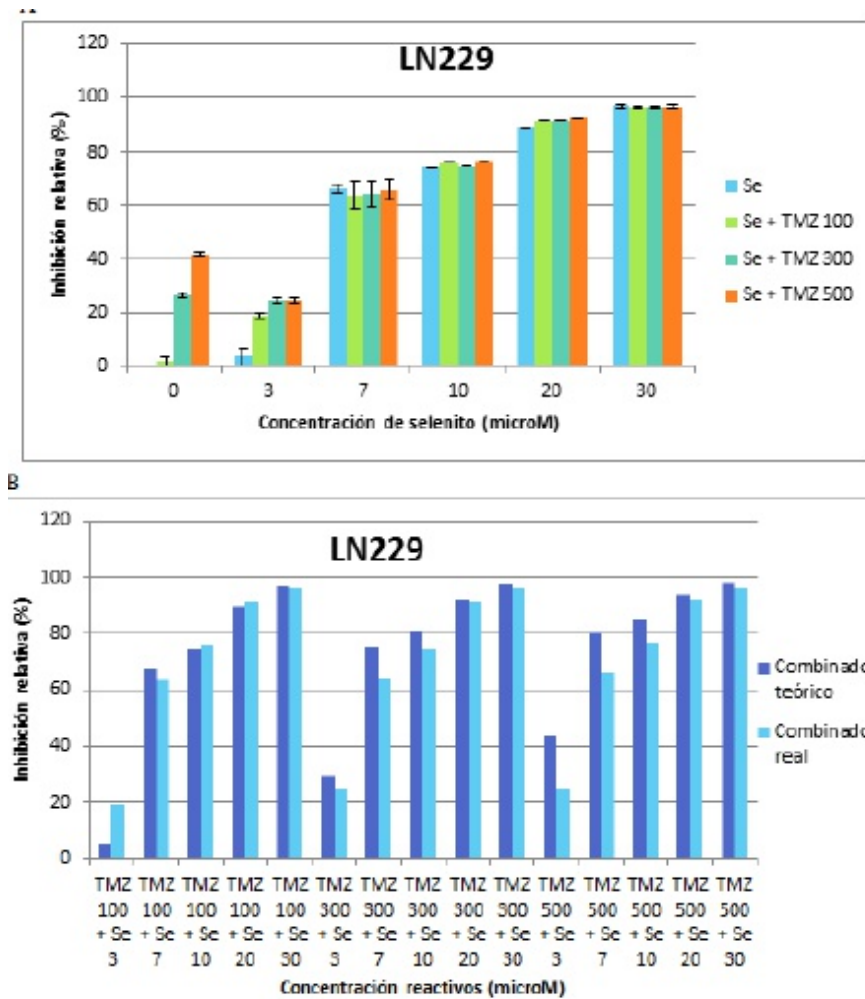
### **Análisis del ciclo celular**

Para el análisis del ciclo celular, las células fueron tratadas con sus respectivos fármacos así como sus controles correspondientes durante 72 horas en placas de 6 pocillos, sembrando 80000 células por pocillo y añadiendo 1,5 ml de DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y ATB (antibiótico, estreptomina + anfotericina B) al 1%. Pasados tres días, fueron tripsinizadas, lavadas y centrifugadas a 3500 rpm durante 2 o 3 minutos. A continuación, para fijar las células, se añadió etanol al 70% mientras se vortearan los tubos de FACS para incubarlos posteriormente a 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el etanol centrifugando a 3500 rpm durante 2 minutos. Tras resuspender el pellet en PBS se añadieron 250  $\mu$ l de solución de extracción de DNA, compuesto por 183ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M y 8 ml de ácido acético 0,1 M a pH 7,8. Se incubó 10 minutos a 37°C. Se añadieron 250  $\mu$ l de solución de yoduro de propidio (PBS + 100 $\mu$ g/ml ARNasa + 40  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio). Tras incubar 30 minutos a 37°C en oscuridad, finalmente fueron analizadas mediante un citómetro de flujo celular (FACScalibur 255 (CellQuest)) en el que se estudió el contenido de ADN.

### **Resultados**

#### **Selenito combinado con Temozolamida (TMZ) en LN229**

Existe un efecto sumatorio en la combinación del selenito y la TMZ a las siguientes dosis: TMZ 100  $\mu$ M + Se 7  $\mu$ M, TMZ 100  $\mu$ M + Se 10  $\mu$ M, TMZ 100  $\mu$ M + Se 20  $\mu$ M, TMZ 100  $\mu$ M + Se 30  $\mu$ M, TMZ 300  $\mu$ M + Se 20  $\mu$ M, TMZ 300  $\mu$ M + Se 30  $\mu$ M, TMZ 500  $\mu$ M + Se 20  $\mu$ M y TMZ 500  $\mu$ M + Se 30  $\mu$ M. Hay efecto sinérgico en la combinación de TMZ 100  $\mu$ M + Se 3  $\mu$ M. Por tanto, en base a los resultados anteriores podemos decir que a mayor concentración de selenito hay mayor efecto sumatorio con la combinación con TMZ, independientemente de la dosis de TMZ (Figura 1).



**Figura 1.** A) Viabilidad celular en términos de inhibición relativa (%) de la combinación del selenito sódico y la TMZ a diferentes dosis mediante sulforrodamina B. B) Representación del efecto de la inhibición teórica (combinado teórico) y la inhibición real (combinado real) del selenito con la TMZ.

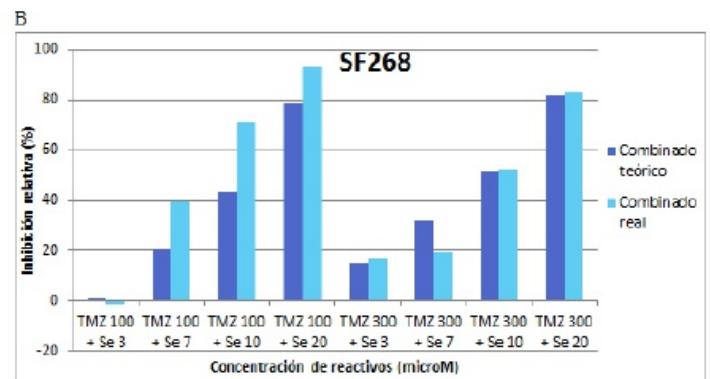
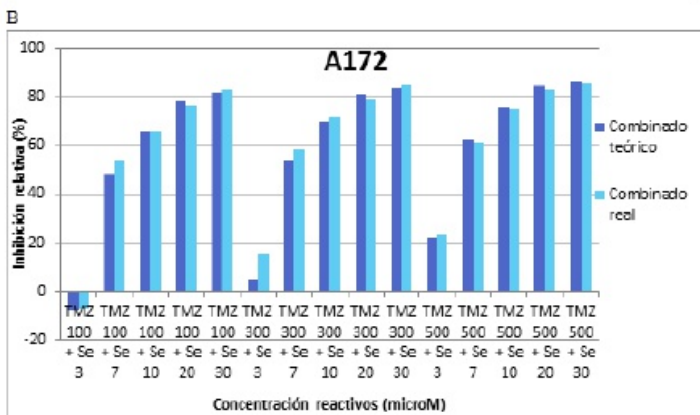
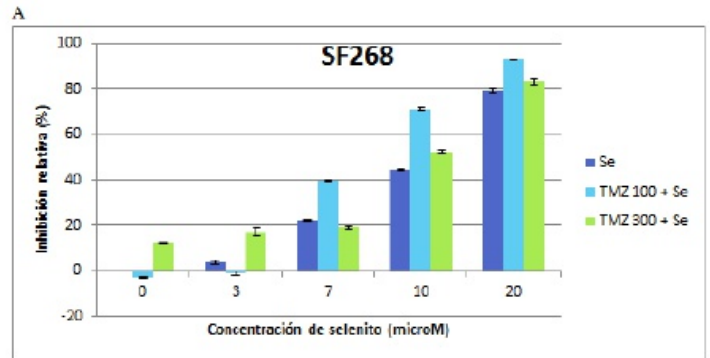
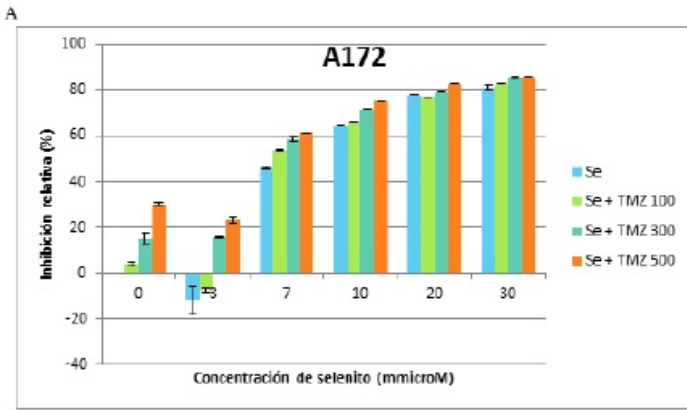
### Selenito combinado con Temozolamida (TMZ) en A172

Existe un efecto sumatorio en las combinaciones TMZ 100  $\mu\text{M}$  + Se 3  $\mu\text{M}$ , TMZ 100  $\mu\text{M}$  + Se 10  $\mu\text{M}$ , TMZ 100  $\mu\text{M}$  + Se 30  $\mu\text{M}$ , TMZ 300  $\mu\text{M}$  + Se 10  $\mu\text{M}$ , TMZ 500  $\mu\text{M}$  + Se 3  $\mu\text{M}$ , TMZ 500  $\mu\text{M}$  + Se 7  $\mu\text{M}$ , TMZ 500  $\mu\text{M}$  + Se 10  $\mu\text{M}$ , TMZ 500  $\mu\text{M}$  + Se 20  $\mu\text{M}$  y TMZ 500  $\mu\text{M}$  + Se 30  $\mu\text{M}$ . Hay un efecto sinérgico en las combinaciones TMZ 100  $\mu\text{M}$  + Se 7  $\mu\text{M}$ , TMZ 300  $\mu\text{M}$  + Se 3  $\mu\text{M}$  y TMZ 300  $\mu\text{M}$  + Se 7  $\mu\text{M}$ . Hay un efecto sinérgico a menos concentración de selenito y un efecto sumatorio a mayor concentración de selenito y a mayor concentración de TMZ (Figura 2).

### Selenito combinado con Temozolamida (TMZ) en SF268

Puede observarse un efecto sumatorio en las combinaciones TMZ 300  $\mu\text{M}$  + Se 3  $\mu\text{M}$ , TMZ 300  $\mu\text{M}$  + Se 10  $\mu\text{M}$  y TMZ 300  $\mu\text{M}$  + Se 20  $\mu\text{M}$ . Hay un efecto sinérgico en las combinaciones TMZ 100  $\mu\text{M}$  + Se 7  $\mu\text{M}$ , TMZ 100  $\mu\text{M}$  + Se 10  $\mu\text{M}$  y TMZ 100  $\mu\text{M}$  + Se 20  $\mu\text{M}$ . Por tanto, existe un efecto sinérgico con selenito a las dosis de TMZ 100  $\mu\text{M}$  y un efecto sumatorio con selenito a las dosis de TMZ 300  $\mu\text{M}$  (Figura 3).

El selenito a dosis citotóxicas, en este caso selenito a 20  $\mu\text{M}$  (con una inhibición del 68,1%), detiene a las células en fase S con



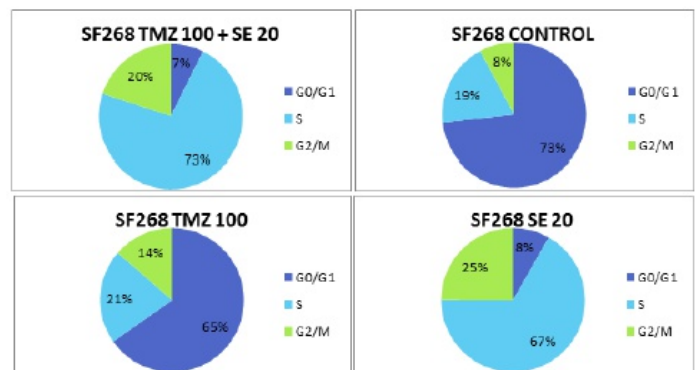
**Figura 2.** A) Viabilidad celular en términos de inhibición relativa (%) de la combinación del selenito sódico y la TMZ a diferentes dosis mediante sulforrodamina B. B) Representación del efecto de la inhibición teórica (combinado teórico) y la inhibición real (combinado real) del selenito con la TMZ.

**Figura 3.** A) Viabilidad celular en términos de inhibición relativa (%) de la combinación del selenito sódico y la TMZ a diferentes dosis mediante sulforrodamina B. B) Representación del efecto de la inhibición teórica (combinado teórico) y la inhibición real (combinado real) del selenito con la TMZ.

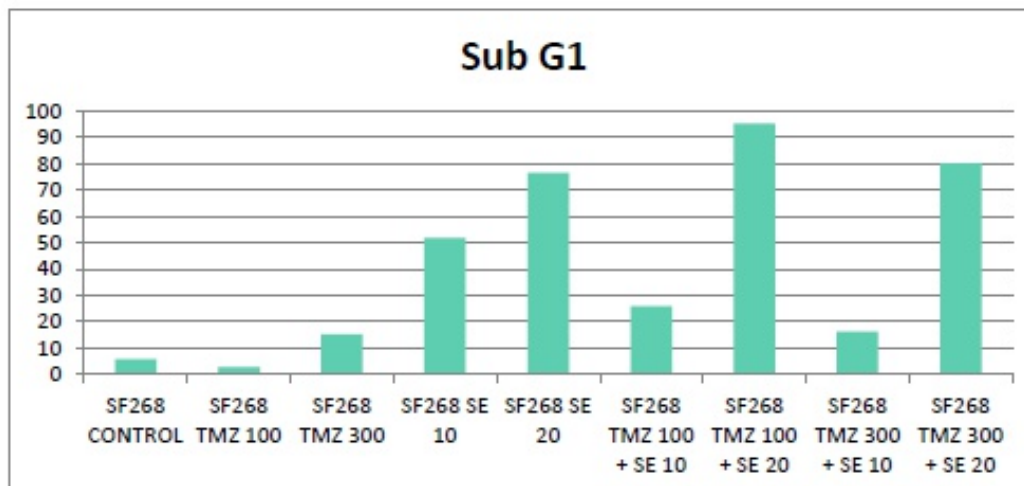
un porcentaje del 67% del total. Por el contrario, la TMZ a dosis de 100  $\mu\text{M}$  (con una inhibición del 2,5%) con un porcentaje del 65%. La combinación de selenito 20  $\mu\text{M}$  y la TMZ 100  $\mu\text{M}$  (con una inhibición del 92,9%) también detienen a las células en fase S, en un porcentaje del 73%, teniendo el mismo comportamiento que el uso del selenito a 20  $\mu\text{M}$  solo (Figura 4).

$\mu\text{M}$  solo (Figura 4). Al representar el porcentaje de células en apoptosis con los diferentes tratamientos, (figura 5), se aprecia que el uso combinado del selenito 20  $\mu\text{M}$  (76,4% SubG1) y la GMTMZ 100  $\mu\text{M}$  (2,7% SubG1), provoca una sinergia al generar más apoptosis (95,1 % SubG1) que los tratamientos por separado (Figura 5).

El selenito a dosis citotóxicas, en este caso selenito a 20  $\mu\text{M}$  (con una inhibición del 68,1%), detiene a las células en fase S con un porcentaje del 67% del total. Por el contrario, la TMZ a dosis de 100  $\mu\text{M}$  (con una inhibición del 2,5%) con un porcentaje del 65%. La combinación de selenito 20  $\mu\text{M}$  y la TMZ 100  $\mu\text{M}$  (con una inhibición del 92,9%) también detienen a las células en fase S, en un porcentaje del 73%, teniendo el mismo comportamiento que el uso del selenito a 20



**Figura 4.** Distribución celular en cada fase del ciclo celular



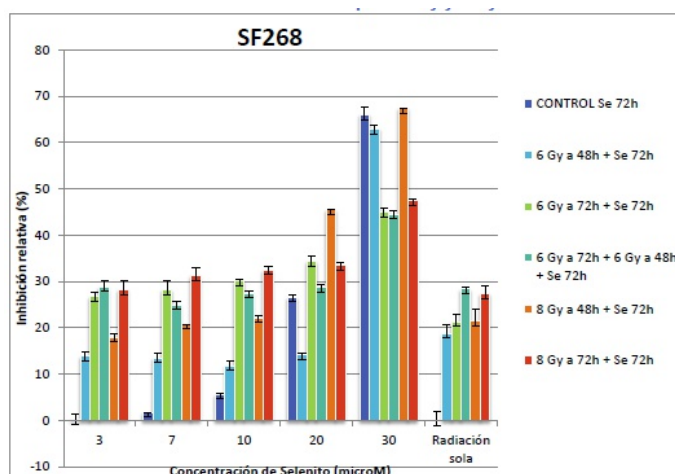
**Figura 5.** Representación de la fase SubG1.

### Selenito combinado con radioterapia a 6 Gy y 8 Gy en SF268

El selenito a dosis no citotóxicas (3uM, 7uM y 10uM) no tiene ningún efecto sobre las células, y por tanto lo que mata es la RT en sí misma.

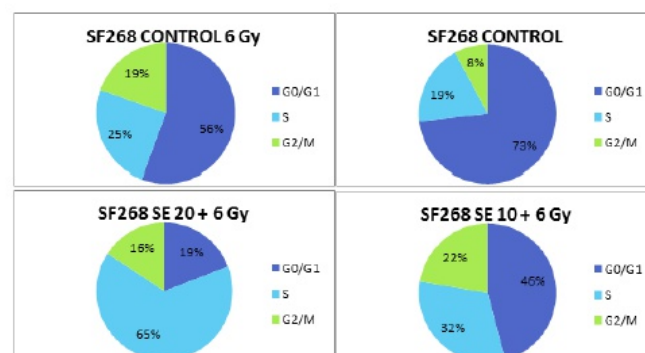
- El selenito a dosis citotóxicas (20uM y 30uM), en el caso de 8Gy a 48h y Se a 20uM sí se suman plenamente. Sin embargo, a 6Gy a 48h sí se ve cierta protección del Se frente a la radio ya que la dosis de RT es menor.

- La IC50 del selenito está más alta (20-30uM) respecto a los experimentos anteriores (7-10uM). Solo se ha alcanzado en el control y en las dosis de RT a 48h.



**Figura 6.** Viabilidad celular en términos de inhibición relativa (%) de la combinación del selenito sódico y la irradiación a diferentes dosis mediante sulforrodamina B.

Las células radiadas con 6Gy (con una inhibición del 7,9%) detienen las células en fase G0/G1 en un 56%, al igual que la combinación con selenito a 10 µM en un 46%. Sin embargo, en combinación con el selenito 20 µM, las células se detienen en fase S en un 65%. Solo la combinación con selenito a 20 µM afecta al mecanismo de acción de la irradiación a 6 Gy (Figura 7).

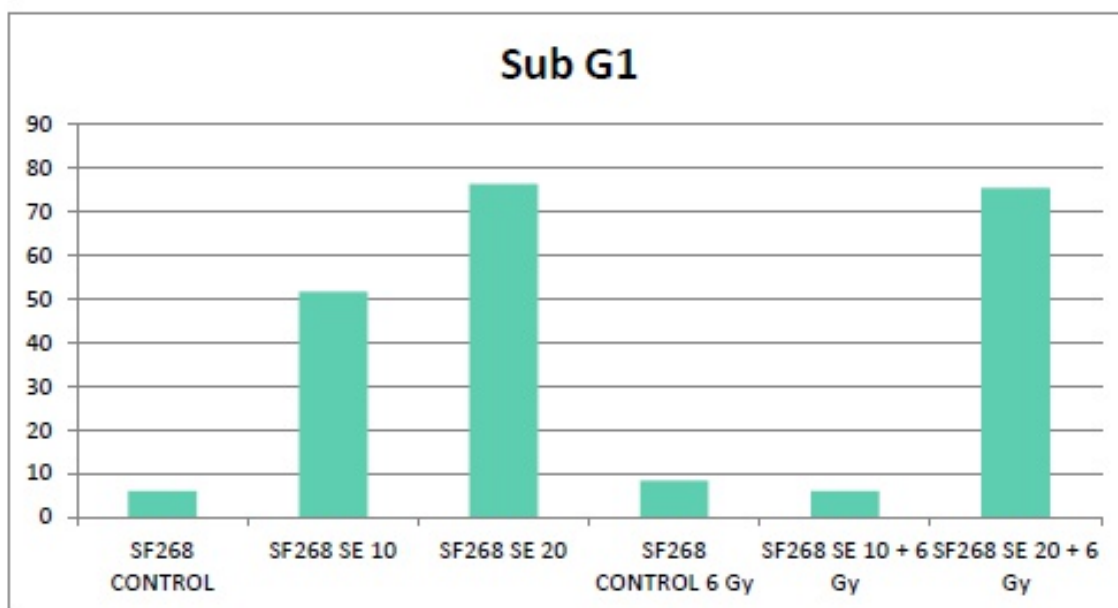


**Figura 7.** Distribución celular en cada fase del ciclo celular para la irradiación a 6 Gy, las combinaciones con selenito 10 µM y 20 µM y el control (sin tratamiento).

Al representar el porcentaje de células en apoptosis con los diferentes tratamientos, (figura 8), se aprecia que el uso combinado con el selenito 10  $\mu\text{M}$  (5,9% SubG1) provoca un efecto de interferencia con una inhibición similar a las células irradiadas con 6 Gy. Mientras que la combinación con selenito a 10  $\mu\text{M}$  (5,9% SubG1) también produce una interferencia pero con una inhibición similar a la del selenito a 20 (75,4%).

## Discusión

Por un lado, los resultados obtenidos de IC50 de selenito en las diferentes líneas celulares ponen de manifiesto la elevada sensibilidad de las células tumorales al mismo, ya que se trata de concentraciones muy bajas comprendidas entre los 3 y 20  $\mu\text{M}$ . Tanto es así que la línea SF-268, que es extremadamente resistente a la TMZ (fármaco utilizado en clínica en glioblastoma multiforme), dado que sobreexpresa MGMT,



**Figura 8.** Representación de la fase SubG1.

exhibe también una elevada sensibilidad al selenito (7-10  $\mu\text{M}$ ). Además, lo interesante de este punto radica en que el selenito tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y, por tanto, podría ser efectivo in vivo contra el glioblastoma. Se han realizado estudios previos con hepatocitos en los que se demuestra que el selenito presenta una IC50 en células normales entre 50-100  $\mu\text{M}$ . Los valores de IC50 obtenidos se encuentran dentro de rangos plasmáticos tolerados por el ser humano. Esto ha sido recientemente demostrado en un ensayo clínico en fase I desarrollado en el Instituto Karolinska. En los resultados de la combinación de TMZ y selenito se observa un efecto sinérgico en algunas dosis y sumatorio en el resto. La mayor sinergia se observa en la línea SF268, que es resistente a TMZ porque

presenta demetilado el promotor de MGMT. Este hecho ha podido confirmarse con los datos de subG1 de ciclo celular obtenidos. En el caso de la TMZ, el selenito al detener las células en fase S facilitaría la acción de la TMZ que al ser un agente alquilante actúa preferentemente en esta fase.

## Conclusión

El selenito sódico presenta una potente actividad antitumoral frente a líneas celulares de glioblastoma multiforme y glioma anaplásico, presentando asimismo mayor actividad en combinación con TMZ y potenciando la acción de la RT a ciertas dosis.

## Bibliografía

1. Mehdi Y, Hornick J, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the Environment, Metabolism

- and Involvement in Body Functions. *Molecules*. 2013;18(3):3292-311.
2. Pechová A, Antošová L, Pavlata L, Podhorský A. Effect of sodium selenite or lactateprotein selenium complex supplementation on selenium status in goat kids. *Czech J Anim Sci*. 2016;60(1):16-24.
  3. Faixová Z, Piešová E, Maková Z, Čobanová K, Faix Š. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on ruminal enzyme activities and blood chemistry in sheep. *Acta Vet Brno*. 2016;85(2):185-94.
  4. White S, Johnson S, Bobel J, Warren L. Dietary selenium and prolonged exercise alter gene expression and activity of antioxidant enzymes in equine skeletal muscle. *J Anim Sci*. 2016;94(7):2867.
  5. Jokic G, Vuksa M, Djedovic S, Stojnic B, Kataranovski D, Kljajic P et al. Rodenticide efficacy of sodium selenite baits in laboratory conditions. *Arch Biol Sci*. 2014;66(3):1083-9.
  6. McAdam PA, Levander OA. Chronic toxicity and retention of dietary selenium fed to rats as D- or L-selenomethionine, selenite, or selenate. *Nutr Res*. 1987;7(6):601-10.
  7. Satoh M, Naganuma A, Imura N. Effect of coadministration of selenite on the toxicity and antitumor activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) given repeatedly to mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;30(6):439-43.
  8. Noori S. Sodium selenite attenuated cisplatin-induced toxicity in rats: role of electrolytes homeostasis. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2015 [cited 20 June 2017]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013747>.
  9. Spyrou G et al. Selenite and selenate inhibit human lymphocyte growth via different mechanisms. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2015 [cited 20 June 2017]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8813134>.
  10. Olm E, Jönsson-Videsäter K, Ribera-Cortada I, Fernandes A, Eriksson L, Lehmann S et al. Selenite is a potent cytotoxic agent for human primary AML cells. *Cancer Lett*. 2009;282(1):116-23.
  11. Olm E. Cytotoxic mechanisms of selenium in cancer. Karolinska Institutet; 2015.
  12. Redirect [Internet]. Globocan.iarc.fr. 2017 [cited 23 June 2017]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
  13. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, PGlycoprotein and CD133 Expression. *PLOS ONE*. 2015;10(10):e0140131.
  14. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub M, Vescovo L et al. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Medicine*. 2013;10(5):e1001453.