



## **TESIS DOCTORAL**

---

# **Desarrollo de nuevas herramientas para la mejora del pronóstico de pacientes con Glioblastoma Multiforme**

---

**Elisa Checa Chavarría**

**Director: Dr. Eduardo Fernández Jover**

**Programa de Doctorado en Bioingeniería**

Universidad Miguel Hernández de Elche

Instituto de Bioingeniería

Año 2018



---

**Programa de Doctorado en Bioingeniería**

JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ, Coordinador del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 0169/17, de 1 de febrero de 2017:

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Desarrollo de nuevas herramientas para la mejora del pronóstico de pacientes con Glioblastoma Multiforme*” ha sido realizada por D<sup>a</sup>. Elisa Checa Chavarría con DNI 48412138J, bajo la dirección del Profesor Eduardo Fernández Jover, y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, firma el presente Certificado en Elche a

Profesor José Manuel Pérez Pérez  
Coordinador del Programa de Doctorado en Bioingeniería



Prof. Eduardo Fernández Jover, Catedrático de Biología Celular y Director del Grupo de Neuroingeniería Biomédica de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que la memoria presentada para optar al grado de Doctor en Bioingeniería por la Universidad Miguel Hernández de Elche por D<sup>a</sup> Elisa Checa Chavarría con DNI 48412138J, titulada *“Desarrollo de nuevas herramientas para la mejora del pronóstico de pacientes con Glioblastoma Multiforme”* ha sido realizada bajo su dirección. Que ha revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo dando su conformidad para que la misma sea presentada y defendida a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente Certificado en Elche a

Fdo. Eduardo Fernández Jover

Director



---

**Programa de Doctorado en Bioingeniería**

La Tesis Doctoral titulada “*Desarrollo de nuevas herramientas para la mejora del pronóstico de pacientes con Glioblastoma Multiforme*” realizada por D<sup>a</sup>. Elisa Checa Chavarría con DNI 48412138J, bajo la dirección del Profesor Eduardo Fernández Jover se presenta con los siguientes índices de calidad según el Campo 4 de Ciencias Biomédicas:

- Alejandro Cabrera-García, Elisa Checa-Chavarría, Jesús Pacheco-Torres, Ángela Bernabeu-Sanz, Alejandro Vidal-Moya, Eva Rivero-Buceta, Germán Sastre, Eduardo Fernández and Pablo Botella. Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T1-T2 Dual Magnetic Resonance Imaging. **Nanoscale** (2017)- DOI 10.1039/C7NR07948F







## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi director Eduardo Fernández la oportunidad que me dio al poder hacer el Trabajo Final de Máster y posteriormente la tesis en el grupo de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual y poder formar parte su equipo. Durante todos estos años he tenido la ocasión de formar parte de proyectos muy diversos. Gracias a los cuales he podido aprender muchísimo a tu lado sobre una gran variedad de temas.

También me gustaría dar las gracias, especialmente, a Pablo Botella por diseñar las moléculas con las que he trabajado este tiempo y por su ayuda en el diseño de los experimentos y en el análisis de los resultados. Por supuesto, no me olvido de todos mis compañeros del laboratorio con quienes he compartido un montón de momentos inolvidables y quienes me han ayudado, día a día, a sacar este trabajo adelante. ¡A todos vosotros muchas gracias!

También agradecer a todos mis amig@s por hacer que estos años sean más llevaderos. Especialmente el último de año de tesis, que me llenasteis la agenda de bodas, despedidas y preparativos. Con tantos planes, prácticamente, no me dio tiempo a pensar en otras cosas.

Por último, pero no menos importante, quiero dar mil gracias a Javi, a Daniel y a mis padres. Por estar siempre ahí y por darme todo el apoyo y toda la ayuda que han podido durante este tiempo. Vosotros habéis sido los mayores apoyos. No ha sido fácil, pero entre todos hemos conseguido acabar este proyecto. Especialmente, agradecer a mis padres todo lo que han hecho por mí, por mi educación y por los valores que me han transmitido. Tengo claro que sin todo el esfuerzo que ellos han hecho durante todos estos años yo no habría podido llegar hasta aquí.

Muchas gracias a todos vosotros y a todas aquellas personas, las que están y las que ya no, que de una forma u otra han contribuido a que yo ahora mismo esté acabando una tesis centrada en investigar cómo combatir el cáncer.



## ABSTRACT

At present, cancer is one of the world main problems because of its great mortality. The main objective of this thesis has been the improvement of the prognosis of those patients affected of Glioblastoma Multiforme, the most frequent and aggressive type of brain tumour. Currently, the existing treatments are very aggressive and lack of effectiveness, the mean life expectancy is around 15 months. To fulfil our objectives, the Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual of the Instituto de Biongeniería from the Universidad Miguel Hernández, together with the Instituto de Tecnología Química, from the Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, have worked in the development of new diagnosis tools and therapeutic approaches. Regarding the improvement of diagnosis, we present new contrast agents for Magnetic Resonance Imaging. The first of them is based on Gd-Si oxide nanoparticles is visible in sequence  $T_1$ , constituted with Gadolinium, increases the imaging resolution of the organs and any other anatomical structure. This first contrast agent let us develop a second contrast agent, on which we have focused the biocompatibility assays through this work, the molecule  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ . This agent is visible both in sequences  $T_1$  and  $T_2$ , enabling an improved visualization of the anatomy and morphology of all organs and the pathological processes of interest. Therefore, this second contrast agent could be a powerful tool to make early and precise diagnosis.

On the other hand, we have worked in novel therapeutic approaches to treat Glioblastoma Multiforme. In this work we present a new prodrug derived from Camptothecin and 5-aminolevulinic acid. The result of this modification of the CPT-5ALA molecule, which is selective for tumoral cells. We have studied the potential anticancer properties both *in vitro* and *in vivo* to determine the possible clinical use of this drug.

In this work, we have analysed and characterized the biocompatibility and security profile of the contrast agent and the prodrug, both in *in vitro* and *in vivo* models do determine whether the clinical use of this compounds is possible.

Nowadays, medicine is far from curing Glioblastoma Multiforme. The short-term objective is the development of new approaches that allow improving the life expectancies of patients. In this terms, early diagnosis and selective therapies move us closer to achieve this objective.



## RESUMEN

Actualmente el cáncer es una de las principales preocupaciones a nivel mundial debido a su alta mortalidad. El principal objetivo que se ha perseguido en este trabajo ha sido la mejora del pronóstico de los pacientes afectados por el tumor cerebral más común y letal, el Glioblastoma Multiforme. Los tratamientos actuales son muy agresivos y además carecen de eficacia, por lo que su esperanza de vida media se encuentra entorno a los 15 meses. Para conseguir tal fin, la Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández junto con el Instituto de Tecnología Química, perteneciente a la Universidad Politécnica de Valencia y el CSIC, han trabajado en el desarrollo de herramientas de diagnóstico y nuevas estrategias terapéuticas. En lo que respecta a la mejora del diagnóstico, en este trabajo proponemos nuevos agentes de contraste para Imagen por Resonancia Magnética. El primero de ellos, basado en nanopartículas de óxido Gd-Si, con visibilidad en la secuencia  $T_1$ , constituido con Gadolinio, permitiría mejorar la visibilidad de los órganos y las estructuras anatómicas. Este primer agente de contraste sirvió para la generación del agente de contraste en el cual hemos centrado los estudios de biocompatibilidad a lo largo de este trabajo, la molécula  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ . Dicho agente posee visibilidad en las secuencias  $T_1$  y  $T_2$ , permitiendo una mejora en la visualización tanto de la anatomía y morfología de los órganos como de los procesos patológicos. Por ello, esta molécula podría suponer una herramienta muy potente para realizar diagnósticos precisos y tempranos.

Por otro lado, como nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento del Glioblastoma Multiforme proponemos un nuevo profármaco derivado de la Camptotecina y el ácido 5-aminolevulínico. El resultado de esta modificación es la molécula CPT-5ALA, que posee selectividad hacia las células de este tumor. Se ha investigado la potencial actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo* de esta molécula en modelos de Glioblastoma.

En este trabajo se ha analizado y caracterizado la biocompatibilidad y el perfil de seguridad del agente de contraste y el profármaco, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* para determinar si es posible el uso clínico de estos compuestos.

Actualmente, la medicina está muy lejos de conseguir curar el Glioblastoma Multiforme. El objetivo marcado a corto plazo es realizar avances que permitan aumentar la esperanza de vida de los afectados. En este sentido, favorecer el diagnóstico precoz de esta enfermedad y utilizar una terapia selectiva, podría acercarnos un poco más a conseguir dicho objetivo.



## ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

El principal objetivo de esta tesis doctoral es conseguir mejorar el pronóstico de los pacientes de Glioblastoma Multiforme. Este tumor es el más común y agresivo de todos los tumores cerebrales, ya que su esperanza de vida media se sitúa en los 15 meses. Por esta razón, es necesario buscar nuevas herramientas que mejoren su pronóstico. Esto lo podemos conseguir desde varias vías. La más común es desarrollando nuevas estrategias terapéuticas, pero también podemos mejorar el pronóstico de los afectados por el Glioblastoma Multiforme favoreciendo un diagnóstico precoz, que permita tratar al tumor en fases tempranas, y desarrollando nuevas herramientas que optimicen los estudios preclínicos.

En primer lugar, en este trabajo comenzamos con una Introducción en la que explicamos qué es el Glioblastoma Multiforme, sus características histológicas y moleculares, los tratamientos que tenemos actualmente para combatirlo y los problemas que nos plantean la aparición de resistencia a terapia y la recurrencia. También se exponen las propuestas de Agente de Contraste para Imagen de Resonancia Magnética y de profármaco como herramientas de mejora de diagnóstico y tratamiento, respectivamente. En el Capítulo 3 se explican las diferentes técnicas experimentales empleadas para la caracterización de las moléculas propuestas. Estas técnicas se han optimizado y puesto en marcha a lo largo de este trabajo, ya que esta línea de investigación no estaba implantada previamente. En el Capítulo 4 y 5 explicamos y discutimos los resultados globales obtenidos en estos proyectos de investigación, así como su implicación biológica y sus posibles aplicaciones en el futuro. Finalmente, en el Capítulo 6 enumeramos las conclusiones que se han extraído de este proyecto de investigación.

En este sentido, el planteamiento general seguido para el diseño de las mejoras propuestas en este trabajo se puede clasificar en tres grupos:

- **Bloque 1: Mejoras en el proceso de investigación de ensayos preclínicos que faciliten el desarrollo de nuevos fármacos:** la mejora que se propone en este apartado es un microdispositivo de cultivo celular en tres dimensiones para simular el microentorno tumoral. Este dispositivo puede servir como herramienta para agilizar el *screening* de fármacos antitumorales. Este modelo recrea los factores de hipoxia, falta de nutrientes y matriz celular en tres dimensiones, los cuales no se simulan en las placas en dos dimensiones. Por ello, los resultados obtenidos en estos dispositivos son más representativos del modelo *in vivo* que los obtenidos en las placas de cultivo tradicionales en dos dimensiones. Esta línea de investigación ha dado lugar a la publicación científica titulada

“Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment”, recogida en el **Anexo I**.

- **Bloque 2: Mejoras en el proceso de diagnóstico por imagen de Resonancia Magnética:**

En esta tesis se proponen nuevas moléculas para la mejora de la resolución y contraste de la imagen de Resonancia Magnética y se ha investigado su efecto en el organismo y en modelos *in vitro*. En este trabajo se estudia, en primer lugar, la biocompatibilidad del agente de contraste basado en nanopartículas de óxido Gd-Si, visible en T<sub>1</sub>. La síntesis y los resultados de biocompatibilidad recogidos en este estudio se han descrito en el artículo titulado “Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging”, que se puede consultar en el **Anexo I**.

Posteriormente se estudió la biocompatibilidad del agente de contraste Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>2</sub>@SiO<sub>2</sub>, visible tanto en T<sub>1</sub> como en T<sub>2</sub>. Los resultados del ensayo de biocompatibilidad y el análisis histológico tras su administración sistémica se describen en el artículo “Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T1-T2 Dual Magnetic Resonance Imaging.”, disponible en el **Anexo I**.

- **Bloque 3: Mejoras en el proceso de tratamiento del Glioblastoma Multiforme.** Este es

el bloque más importante de la tesis, ya que comprende el grueso del trabajo. En este bloque se propone el profármaco CPT-5ALA como molécula con potencial para el tratamiento del Glioblastoma Multiforme. Se ha estudiado cómo afecta este compuesto al ciclo celular, la proliferación y la apoptosis de las células de Glioblastoma Multiforme, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Los resultados obtenidos en este bloque se encuentran en el artículo *in process* que tiene como título provisional “CPT-5ALA: Novel derivate to CPT as a new treatment to combat Glioblastoma”.



En la **Figura I** se muestra un esquema de los bloques abordados en este trabajo junto a sus respectivas publicaciones científicas. Al final de la memoria de la tesis doctoral se discuten los resultados globales obtenidos de estas líneas de investigación y las posibles repercusiones que pudieran tener en el aumento de la esperanza de vida de los afectados por el glioblastoma multiforme. Posteriormente a esta discusión, concretamente en el **Anexo I**, se recogen las publicaciones científicas desarrolladas durante este periodo.

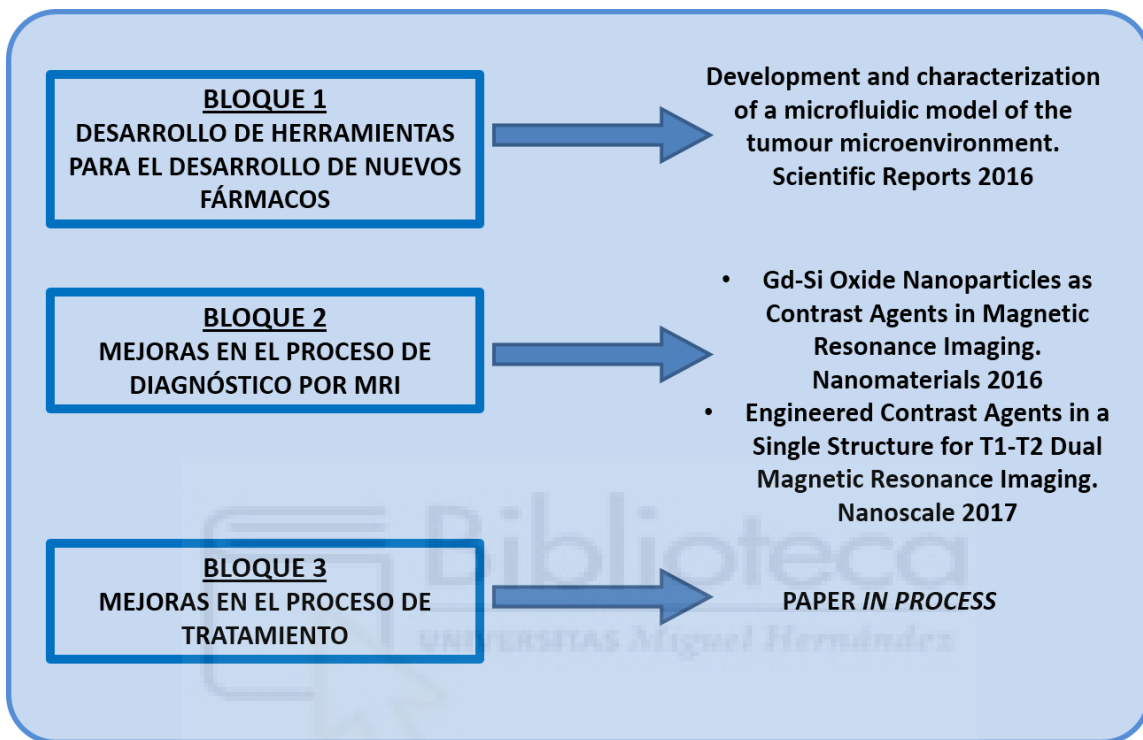


Figura I: Esquema de los temas abordados en este trabajo para la mejora de la calidad de vida del paciente con Glioblastoma Multiforme y las respectivas publicaciones obtenidas en cada una de las partes.



## ABREVIATURAS

|      |  |
|------|--|
| GBM  | Glioblastoma Multiforme  |
| OMS  | Organización Mundial de la Salud   |
| SEOM | Sociedad Española de Oncología Médica  |
| INE  | Instituto Nacional de Estadística  |
| SNC  | Sistema Nervioso Central   |
| MRI  | Imagen por Resonancia Magnética ( <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )                        |
| AC   | Agente de Contraste  |
| Gd   | Gadolinio  |
| TAC  | Tomografía Axial Computarizada   |
| PET  | Tomografía por Emisión de Positrones (Positron Emission Tomography)                          |
| FdG  | <sup>18</sup> F-Fluorodesoxiglucosa  |
| GFAP | Proteína Ácida Fibrilar Glial ( <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )                     |
| PTEN | Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato 3-fosfatasa  |
| HIF  | Factor Inducible por Hipoxia ( <i>Hypoxia Inducible Factor</i> )                             |
| VEGF | Factor de Crecimiento Endotelial Vascular<br>( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )   |
| EGFR | Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico<br>( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ) |
| MGMT | O <sup>6</sup> Metilguanina-DNA-Metiltransferasa   |
| TMZ  | Temozolomida   |
| IDH  | Isocitrato Deshidrogenasa  |
| FDA  | Administración de fármacos y alimentos<br>( <i>Food and Drug Administration</i> )            |
| GSC  | Células madre de Glioblastoma ( <i>Glioblastoma stem cells</i> )                             |
| FTD  | Terapia Fotodinámica ( <i>Photodynamic Therapy</i> )   |
| ABC  | <i>ATP Binding Cassette</i>  |
| BHE  | Barrera Hematoencefálica   |
| CPT  | Camptotecina   |
| PEG  | Polietilenglicol   |
| 5ALA | Ácido 5-aminolevulínico  |
| Top  | Topotecan  |
| Iri  | Irinotecan   |
| PBG  | Porfobilinógeno  |

|       |   |
|-------|---|
| PpIX  | Protoporfirina IX   |
| FGR   | Resección Guiada por Fluorescencia ( <i>Fluorescence Guided Resection</i> ) |
| SEA   | Servicio de Experimentación Animal  |
| PBS   | Tampón Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )                    |
| FBS   | Suero Fetal Bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )                            |
| DIV   | Días <i>in vitro</i>  |
| DMSO  | Dimetilsulfóxido  |
| MTT   | Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio            |
| PFA   | Paraformaldehído  |
| CPTeq | Equivalentes de CPT   |
| MEA   | Ensayo Multielectrodo ( <i>Multi-Electrode Array</i> )                      |
| FSC   | Forward Scatter   |
| SSC   | Side Scatter  |
| IP    | Ioduro de Propidio  |
| FITC  | Isotiocianato de Fluoresceína ( <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i> )         |
| BSA   | Albumina de Suero Bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )                    |
| SEM   | Error estándar de la Media  |



# INDICE DE CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. <i>Cáncer: enfermedad y problema social.....</i>   | <i>1</i>  |
| 1.2. <i>Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) .....</i>  | <i>2</i>  |
| 1.2.1. <i>Sintomatología.....</i>   | <i>2</i>  |
| 1.2.2. <i>Clasificación y Diversidad en Tumores del SNC.....</i>  | <i>4</i>  |
| 1.3. <i>Glioblastoma Multiforme.....</i>  | <i>7</i>  |
| 1.3.1. <i>Epidemiología.....</i>  | <i>8</i>  |
| 1.3.2. <i>Etiología.....</i>  | <i>9</i>  |
| 1.3.3. <i>Síntomas.....</i>   | <i>9</i>  |
| 1.3.4. <i>Diagnóstico: Imagen de Resonancia Magnética.....</i>  | <i>10</i> |
| 1.3.5. <i>Características histológicas.....</i>   | <i>13</i> |
| 1.3.6. <i>Regulación génica del Glioblastoma Multiforme.....</i>  | <i>14</i> |
| 1.3.7. <i>Tratamiento del Glioblastoma Multiforme en la actualidad.....</i>   | <i>19</i> |
| 1.3.8. <i>Nuevos Tratamientos y Enfoques.....</i>   | <i>21</i> |
| 1.4. <i>Barrera Hematoencefálica.....</i>   | <i>23</i> |
| 1.4.1. <i>Estructura y Función.....</i>   | <i>23</i> |
| 1.4.2. <i>Alteraciones de la Barrera Hematoencefálica en Glioblastoma Multiforme.....</i>   | <i>25</i> |
| 1.5. <i>Propuesta de AC de Imagen de Resonancia Magnética dual para T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.....</i>                          | <i>26</i> |
| 1.6. <i>Propuesta de profármaco de CPT-5ALA para el tratamiento del GBM.....</i>  | <i>27</i> |
| 1.7. <i>Camptotecina y Topoisomerasa.....</i>   | <i>28</i> |
| 1.8. <i>Ruta de biosíntesis de porfirinas y hemo: 5ALA.....</i>   | <i>30</i> |
| 1.9. <i>Resumen y Propuesta de Trabajo.....</i>   | <i>32</i> |
| <b>2. CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>3. CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>   | <b>37</b> |
| 3.1. <i>Animales de experimentación.....</i>  | <i>39</i> |
| 3.2. <i>Estudio de la toxicidad del agente de contraste Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub>.....</i> | <i>39</i> |
| 3.2.1. <i>Cultivos celulares y tratamiento con Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub>.....</i>          | <i>40</i> |
| 3.2.2. <i>Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT.....</i>  | <i>41</i> |
| 3.2.3. <i>Ensayo de Biocompatibilidad de AC.....</i>  | <i>42</i> |
| 3.3. <i>Estudio de la actividad anticancerígena y toxicidad del profármaco CPT-5ALA.....</i>  | <i>43</i> |
| 3.3.1. <i>Procedimiento in vitro.....</i>   | <i>43</i> |
| 3.3.1.1. <i>Cultivos celulares.....</i>   | <i>43</i> |
| 3.3.1.2. <i>Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT.....</i>  | <i>44</i> |
| 3.3.1.3. <i>Ensayo de Funcionalidad Neuronal.....</i>   | <i>45</i> |
| 3.3.1.4. <i>Estudios de citometría de flujo.....</i>  | <i>47</i> |

|   |            |
|---|------------|
| 3.3.1.4.1. Ensayo de apoptosis por marcaje con Anexina V/Ioduro de Propidio.....        | 48         |
| 3.3.1.4.2. Ensayo de ciclo celular por marcaje con Ioduro de Propidio.....              | 49         |
| 3.3.2. Procedimiento in vivo.....   | 51         |
| 3.3.2.1. Inoculación y generación del GBM en modelo animal.....                         | 51         |
| 3.3.2.2. Monitorización de los animales y tratamiento con CPT-5ALA.....                 | 52         |
| 3.3.2.3. Procesamiento histológico.....   | 53         |
| 3.3.2.4. Estudio de la actividad anticancerígena de CPT-5ALA.....                       | 53         |
| 3.3.2.5. Ensayo de apoptosis in vivo por método TUNEL.....                              | 55         |
| 3.4. Análisis Estadístico.....  | 55         |
| <b>4. CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....</b>   | <b>57</b>  |
| 4.1. Estudio de la toxicidad del agente de contraste $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ ..... | 59         |
| 4.1.1. Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT.....                           | 59         |
| 4.1.2. Ensayo de Biocompatibilidad de AC.....   | 61         |
| 4.2. Estudio de la actividad anticancerígena y toxicidad del profármaco CPT-5ALA.....   | 62         |
| 4.2.1. Procedimiento in vitro.....  | 62         |
| 4.2.1.1. Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT.....                         | 62         |
| 4.2.1.2. Ensayo de Funcionalidad Neuronal.....  | 67         |
| 4.2.1.3. Estudios de citometría de flujo.....   | 68         |
| 4.2.1.3.1. Ensayo de apoptosis por marcaje con Anexina-V/Ioduro de Propidio.....        | 68         |
| 4.2.1.3.2. Ensayo de ciclo celular por marcaje con Ioduro de Propidio.....              | 70         |
| 4.2.2. Procedimiento in vivo.....   | 72         |
| 4.2.2.1. Monitorización de los animales y tratamiento con CPT-5ALA.....                 | 73         |
| 4.2.2.2. Ensayo de Biocompatibilidad: Análisis histológico.....                         | 74         |
| 4.2.2.3. Estudio de la actividad anticancerígena de CPT-5ALA.....                       | 75         |
| 4.2.2.4. Ensayo de apoptosis in vivo por método TUNEL.....                              | 80         |
| <b>5. CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>6. CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>7. Bibliografía.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>8. ANEXO I: .....</b>  | <b>111</b> |
| <b>9. ANEXO II: Protocolo de Morton &amp; Griffiths.....</b>                            | <b>125</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1: Frecuencias de gliomas según la OMS.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Figura 2: Número de artículos científicos sobre glioblastoma publicados por año en las últimas décadas.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Figura 3: Vías de desarrollo de Glioblastoma. Los glioblastomas secundarios derivan de astrocitomas de menor grado.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Figura 4: Imagen de MRI de sección coronal de estómago y riñones de rata.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>Figura 5: MRI típico de paciente con glioblastoma.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>Figura 6: Principales alteraciones en rutas de señalización celular implicadas en el proceso de oncogénesis del GBM.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Figura 7: Estructura de la Barrera Hematoencefálica y organización de los tipos celulares que la componen.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>Figura 8: Estructura química del profármaco propuesto en este trabajo para tratar el glioblastoma multiforme: la molécula CPT-5ALA.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>Figura 9: Estructura química A) Camptotecina B) Topotecan C) Irinotecan Imagen modificada basa en [60].....</b>   | <b>28</b> |
| <b>Figura 10: Mecanismo de acción de la Topoisomerasa I de DNA y su papel en la Replicación de DNA.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>Figura 11: Interacción entre la CPT y el complejo Topoisomerasa-DNA.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>Figura 12: Estructura química de A) Ácido 5-aminolevulínico B) Protoporfirina IX C) Grupo Hemo.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>Figura 13: Imagen de sección coronal in vivo en secuencia T<sub>1</sub> (Imágenes A y B) y T<sub>2</sub> de rata (Imágenes C y D). A y C) Control sin administración Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub>@PEG; B yD) Imágenes tomadas tras 30 minutos de la administración de 5mg Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub>@PEG.....</b> | <b>40</b> |
| <b>Figura 14: Reacción de Reducción de MTT a Formazán.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>Figura 15: Dispositivo Multi-Electrode Array (60MEA 200/30iR-Ti, casa comercial Multichannel Systems).....</b>  | <b>45</b> |
| <b>Figura 16: Esquema general de citómetro de flujo.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>Figura 17: Estructura química de Ioduro de Propidio.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>Figura 18: Procedimiento llevado a cabo in vivo para caracterización del profármaco CPT-5ALA.....</b>   | <b>51</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 19: Cortes histológicos de órganos de animales tratados y sin tratar con AC teñidos con Hematoxilina/Eosina A-D) Hígado, E-H) Bazo, I-L) Corazón, M-P) Pulmón. Escala 200µm y 100µm. ....</b>   | <b>61</b> |
| <b>Figura 20: Imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fases de células de cultivo primario tratadas 72 horas con CPT-5ALA. ....</b>   | <b>65</b> |
| <b>Figura 21: Imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fases de células U87 tratadas 72 horas con CPT-5ALA. ....</b>   | <b>66</b> |
| <b>Figura 22: Actividad espontánea extracelular (µV) en cultivo de células corticales tras cuatro dosis de 3,2µg CPT-5ALA en DIV25. A) Ventana temporal del registro (ms) B) Clasificación de potenciales de acción en un electrodo. ....</b>   | <b>67</b> |
| <b>Figura 23: Cuadro de dispersión de la población de células C6 tratadas durante 24 horas a concentraciones crecientes de CPT-5ALA en función de la fluorescencia en PE-A y FITC .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>Figura 24: Histograma de la población de células C6 tratadas durante 24h a concentraciones crecientes de CPT-5ALA en función de la intensidad de fluorescencia en PE-A (n=4). División de la población celular en P4 (G0/G1); P5 (S); P6 (M).....</b>  | <b>71</b> |
| <b>Figura 25: Cortes histológicos de órganos de animales tratados y sin tratar con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA teñidos con Hematoxilina/Eosina. ....</b>  | <b>74</b> |
| <b>Figura 26: Reconstrucción muestra de tejido cerebral con GBM Animales Control (A-C) y Tratados con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA (D-F). Núcleos marcados con HOECHST (Azul) y Astrocitos con GFAP (Rojo). Escala 1mm. ....</b>   | <b>76</b> |
| <b>Figura 27: A) Reconstrucción muestra de tejido cerebral con GBM quístico en animal tratado con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Escala 500µm. B) Detalle de límite del GBM quístico. Núcleos marcados con HOECHST (Azul) y Astrocitos con GFAP (Rojo). Escala 100µm. C) Detalle de límite del GBM quístico teñido con Hematoxilina/Eosina. Escala 50µm. ....</b> | <b>77</b> |
| <b>Figura 28: Expresión de GFAP en muestras de tejido cerebral y GBM. Núcleos marcados con HOECHST (Azul) y Astrocitos con GFAP (Rojo). A-C) Animal Control sin tratamiento D-F) Animal Tratado con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Escala 250µm .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>Figura 29: Ensayo de proliferación celular por marcaje de Ki67 (Verde) en el GBM de animales tratados y sin tratar con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Núcleos marcados con HOECHST (Azul). Escala 20µm .....</b>   | <b>79</b> |
| <b>Figura 30: Ensayo de apoptosis por marcaje TUNEL (Verde) en el GBM de animales tratados y sin tratar con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Núcleos marcados con HOECHST (Azul). Escala 20µm .....</b>   | <b>81</b> |





# Introducción



### 1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es el tumor cerebral más común y maligno, su esperanza de vida media se sitúa en torno a los 15 meses. Fue descrito por primera vez a principios del siglo XX, concretamente en el año 1926, por los médicos estadounidenses Percival Bailey y Harvey Cushing. A lo largo de este periodo se han destinado una gran cantidad de recursos para conocer sus características histológicas y moleculares, y así poder diseñar terapias que logren impedir su desarrollo. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados durante este periodo de casi 100 años y todo lo que sabemos sobre él, no hemos sido capaces de establecer un protocolo de tratamiento efectivo. La terapia más efectiva que se ha desarrollado para luchar contra el GBM es la resección quirúrgica. El resto de los tratamientos solamente han conseguido aumentar en unos meses la esperanza de vida.

El diagnóstico precoz de este tumor tiene una gran importancia en el pronóstico y en la respuesta a la terapia. En esta tesis se ha trabajado en la mejora del pronóstico de los pacientes con GBM. Para ello se han estudiado herramientas que permitan la mejora del diagnóstico y nuevos tratamientos que aumenten la respuesta frente a los tratamientos actuales. Atendiendo a este fin, proponemos un nuevo agente de contraste para Imagen por Resonancia Magnética con visibilidad en las secuencias  $T_1$  y  $T_2$  como mejora en el proceso de diagnóstico, y un nuevo profármaco selectivo para las células del GBM para evitar la evolución del tumor. Favoreciendo el diagnóstico precoz y una terapia selectiva esperamos que aumente la esperanza y la calidad de vida de los pacientes afectados por el GBM.

#### 1.1. *Cáncer: enfermedad y problema social*

El cáncer es una terminación genérica que comprende un amplio conjunto de enfermedades causadas por distintas mutaciones que afectan al metabolismo, la división y el ciclo celular. Ocasionando un gran aumento en la tasa de proliferación y en el consumo de nutrientes por parte de las células mutadas. A expensas del correcto funcionamiento de las células vecinas, provocando fallos en el órgano afectado, metástasis y, en ocasiones, la muerte del organismo afectado [1].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente esta enfermedad es la principal causa de muerte a nivel mundial. Concretamente, en el año 2015 se le atribuyeron 8,8 millones de muertes en el mundo, lo que implica alrededor de un 14% de las defunciones. En lo que a España se refiere, según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y el Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2016 se diagnosticaron cerca de 220.000 casos de cáncer, y se produjeron aproximadamente 120.000 muertes debido a esta enfermedad. Siendo la

segunda causa de mortalidad en nuestro país, con un 27% de las muertes. Por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio, que ocasionan un 29,2% del total de las muertes.

Atendiendo a las predicciones poblacionales realizadas por la OMS, se espera un gran aumento en el número de casos de cáncer diagnosticados y el número de muertes asociadas a esta enfermedad. Concretamente, estas estimaciones indican que en el año 2035 se incrementará la incidencia de cáncer, aproximadamente, hasta un 70%. Alcanzando los 24 millones de nuevos casos en el mundo. Este aumento se deberá principalmente al envejecimiento de la población en Estados Unidos y Europa, al estilo de vida sedentario y la mala alimentación. Considerando todos estos datos, el desarrollo de una terapia efectiva contra el cáncer adquiere un carácter de máxima urgencia ya que se prevé que el número de muertes producidas por esta enfermedad aumentará a más de 14 millones de personas para el año 2035.

Las investigaciones llevadas a cabo durante las últimas décadas han permitido identificar una gran variedad de tipos de tumores. Cada uno de ellos originado por diferentes tipos celulares y con un perfil génico más o menos característico. En función del tipo de célula precursora del tumor y de su perfil génico, éste tendrá un fenotipo y un pronóstico diferente para el paciente. Concretamente, en lo que se refiere al Sistema Nervioso, diferenciamos una gran diversidad de tumores debido a la elevada heterogeneidad celular que lo conforma [2], [3].

### 1.2. Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC)

Los tumores del SNC comprenden cualquier tipo de tumor originado a partir de células cerebrales, meninges o nervios. Dentro de esta clasificación, se incluyen las neoplasias primarias o secundarias que aparecen en la zona comprendida por el encéfalo y la médula espinal. Según datos de la SEOM, suponen un 1,3% del total de los cánceres diagnosticados, de los cuales un 71% de ellos son mortales. Dada la gran diversidad celular que conforma el SNC, podemos encontrar una gran variedad de neoplasias. En consecuencia, el pronóstico de los tumores del SNC, varía enormemente en función del tipo de tumor y su perfil genético.

#### 1.2.1. Sintomatología

A pesar de los diferentes tipos de tumores que pueden aparecer en el SNC, la mayoría de ellos presentan ciertos síntomas comunes que son debidos principalmente al denominado *efecto masa*. Al estar rodeado del cráneo, el cerebro tiene poca capacidad de expansión. Cuando el tumor aumenta de tamaño, el cerebro puede llegar a comprimirse y presionar con el cráneo. Esto hace que aumente la presión intracraneal, ocasionando síntomas como dolores de cabeza, visión borrosa, náuseas, vómitos, ataxia, epilepsias. En función de la zona del encéfalo afectada

por el tumor, también pueden ocurrir episodios de pérdida de control y conocimiento o convulsiones [4]. El conjunto de estos síntomas puede llegar a suponer una gran disminución en la calidad de vida del paciente. Se deben tomar medidas paliativas para hacer frente a estos síntomas y evitar accidentes cuando se presente el episodio.

Además de síntomas generales inespecíficos, los tumores del SNC presentan también síntomas específicos que dependen de la ubicación y el tamaño del tumor. Generalmente, aparecen como consecuencia de la destrucción tisular que provoca el tumor en el encéfalo. En la **Tabla 1** se muestra la gran diversidad de síntomas que pueden presentar los tumores del SNC en función de la localización de la lesión tumoral en el cerebro.

**Tabla 1: Sintomatología derivada de la localización anatómica del tumor [4].**

| Localización                             | Semiología   |
|--|--|
| Lóbulo Temporal                          | Trastornos de conducta, lenguaje y memoria. Dificultad para reconocer e interpretar sonidos.   |
| Lóbulo Parietal                          | Dislexia y dificultad para integrar y comprender el lenguaje. Pérdida de visión espacial y dificultad para interpretar figuras complejas. Pérdida de sensibilidad al tacto, temperatura y dolor. |
| Lóbulo Occipital                         | Ataxia. Alteraciones en el reconocimiento de personas. Déficit y desorientación visual.  |
| Lóbulo Frontal                           | Apatía y afasia. Alteraciones en el comportamiento social. Pérdida de conciencia. Hemiparesia y torpeza en movimientos y alteraciones motoras.   |
| Raíces sensitivas y motoras de la médula | Parestesias, hemiparesias y crisis motoras.  |

Como hemos visto, los síntomas que pueden presentar los tumores del SNC son muy diversos. En función de su tamaño y localización, pueden afectar a una gran variedad de funciones vitales. Por lo que presentan un cuadro médico muy amplio. Estos síntomas pueden afectar gravemente a la calidad de vida del paciente, además de ser dolorosos e incluso peligrosos para la vida cotidiana. Por esta razón, además del tratamiento antitumoral, es necesario administrar a estos pacientes tratamiento paliativo para controlar estos síntomas. Debiéndose suministrar antiinflamatorios para reducir la presión intracraneal y el efecto masa, y antiepilépticos cuando sean necesarios.

1.2.2. Clasificación y Diversidad en Tumores del SNC

La gran pluralidad de tipos celulares presentes en el tejido nervioso motiva la aparición de una gran diversidad de tumores, con diferentes síntomas y pronóstico. La **Tabla 2** enumera los diferentes tipos de tumores del SNC clasificados en función del tipo celular o tejido neural originario. A esta gran variedad también se le deben añadir los tumores metastáticos en el SNC procedentes del exterior del SNC. Los tumores del SNC que se presentan con mayor frecuencia son los astrocitomas anaplásicos, también conocidos como glioblastomas, y los meningiomas, los cuales suponen entre un 40 y un 30% de los casos [5].

**Tabla 2: Clasificación de tumores del Sistema Nervioso Central según la OMS [6].**

|   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Tumores oligodendrogiales y astrocíticos difusos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tumores astrocíticos                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Astrocitoma difuso</li> <li>▪ Astrocitoma anaplásico</li> <li>▪ Glioblastoma</li> <li>▪ Glioma difuso de línea media</li> </ul> </li> <li>▪ Tumores oligodendrogiales</li> <li>▪ Gliomas Mixtos                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Oligodendroglioma</li> <li>▪ Oligodendroglioma anaplásico</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>▪ <b>Tumores ependimarios</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ependimoma mixopapilar</li> <li>▪ Ependimoma anaplásico</li> <li>▪ Subependimoma</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Tumores neuronales y mixtos neurogliales</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ganglioglioma</li> <li>▪ Gangliocitoma</li> <li>▪ Ganglioglioma anaplásico</li> <li>▪ Neurocitoma central</li> <li>▪ Neurocitoma extraventricular</li> <li>▪ Paraganglioma</li> <li>▪ Tumor neuroepitelial disembrionárico</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Linfoma primario asociado al sistema nervioso central</b></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Tumores no Gliales</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tumores embrionarios                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Meduloblastoma</li> <li>▪ Tumor embrional con rosetas multicapa</li> <li>▪ Meduloepitelioma</li> </ul> </li> <li>▪ Tumores del plexo coroideo                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Papiloma del plexo coroideo</li> <li>▪ Carcinoma del plexo coroideo</li> </ul> </li> <li>▪ Tumores de la región pineal                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pineoblastoma</li> <li>▪ Pineocitoma</li> <li>▪ Tumor del parénquima pineal de diferenciación intermedia</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>▪ <b>Tumores meníngeos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Meningioma</li> <li>▪ Meningioma fibroso</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Tumores melanocíticos</b></li> <li>▪ <b>Tumores de la región selar</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tumor de células granulares</li> <li>▪ Carcinoma de la hipófisis</li> <li>▪ Pituicitoma</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Tumores de los nervios craneales y paraespinales</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Schwannoma</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Tumores metastáticos</b></li> </ul> |
|---|--|

Cada uno de los tumores mencionados en la **Tabla 2** presenta unas características histológicas y sintomáticas específicas a causa de la variedad entre sus células originarias. La variedad de tumores se incrementa, más aún, gracias a que un mismo tipo celular es capaz de derivar en distintos tipos de tumores. Esto es debido al perfil genético que pueden ir adquiriendo las células cancerígenas con el tiempo por medio de mutaciones, generando los subtipos de las diferentes clases de tumores de SNC.

Una de las formas más extendidas de clasificar los tumores del SNC es en función de la célula de origen. Esta clasificación nos permite distinguir los tumores como gliales (originados a partir de astrocitos, oligodendrocitos o microglía) y no gliales [7]. Dado que el objetivo de este trabajo es el desarrollo de compuestos para el diagnóstico y el tratamiento del glioblastoma multiforme, un tumor glial originado por astrocitos, nos centraremos en explicar únicamente los tipos de tumores derivados de la glía. Este grupo representa más de la mitad de los tumores cerebrales y lo constituyen los astrocitomas, los oligodendrocitomas y ependiomas [6], [8].

En la **Tabla 3** se enumeran los distintos tipos de astrocitomas, tumores originarios de astrocitos. En función del grado de degeneración que pueden llegar a ocasionar en el paciente y sus características histológicas, la OMS los clasifica desde grado I a IV [6].

Entre los astrocitomas de menor grado (Grado I) encontramos el astrocitoma de bajo grado y el astrocitoma pilocítico. El primero de ellos suele aparecer en jóvenes entre los 20 y los 30 años. Presenta unos límites definidos ya que no infiltra en el tejido sano. Esto hace que se pueda eliminar completamente de forma quirúrgica, evitando la necesidad de tratar posteriormente el tumor con quimio o radioterapia. El astrocitoma pilocítico es un tumor cerebral no metastático común en niños, usualmente aparece entre los 5 y los 20 años. Se caracteriza por presentar una densidad celular y una tasa de mitosis bajas, por lo que el ritmo de crecimiento de este tumor es lento. En algunos casos hay angiogénesis, proliferación celular y atipia nuclear, pero no es común. Suele aparecer en el cerebelo y el tronco cerebral. Generalmente su resección quirúrgica es completa por lo que tampoco es necesario administrar un tratamiento postoperatorio.

El astrocitoma de Grado II más común es el astrocitoma difuso. Este tumor, al igual que el astrocitoma de bajo grado, suele aparecer entre los 20 y los 30 años, y su crecimiento es lento por su baja tasa de mitosis. Tiende a infiltrarse de forma difusa entre el parénquima cerebral circundante al tumor, generando focos metastáticos. El astrocitoma difuso presenta una predisposición a evolucionar hacia astrocitomas más malignos como el astrocitoma anaplásico y excepcionalmente en glioblastoma. Suele aparecer en el lóbulo frontal o temporal.

El siguiente tumor en grado de malignidad según la OMS es el astrocitoma anaplásico, clasificado como astrocitoma de Grado III. Difiere del astrocitoma difuso de grado II en el grado de malignidad y en la presencia de focos anaplásicos con alta densidad celular. La prevalencia es mayor en hombres que en mujeres y suele aparecer a partir de los 40 años. Su histología no muestra vascularización ni necrosis en el tejido tumoral. La extirpación quirúrgica no es completa por el carácter difuso del tumor. Por lo que su tratamiento se debe complementar con radio y quimioterapia. El astrocitoma anaplásico tiene una gran tendencia a derivar en un glioblastoma. Según la clasificación de la OMS, este es el tumor cerebral más maligno y se le

## 1. Introducción

atribuye un grado IV. La incidencia máxima de este tumor se encuentra entre los 50 y 70 años. Suele aparecer en la materia blanca subcortical del hemisferio cerebral. Las células están muy indiferenciadas y tienen una tasa de mitosis muy elevada. Se caracteriza por un alto grado de infiltración en el tejido no tumoral, pudiendo llegar incluso a migrar al hemisferio contralateral a través del cuerpo calloso. Esto hace que la resección quirúrgica sea incompleta y que se deba suplementar el tratamiento con quimio y radioterapia.

**Tabla 3: Características y clases de los astrocitomas descritos actualmente según la OMS [6], [7]**

| Tumor                     | Grado | Edad       | Características histológicas y morfológicas  |
|---------------------------|-------|------------|--|
| Astrocitoma de bajo grado | I     | 20-30 años | Presenta límites bien definidos, no infiltrante en tejido sano. Eliminación quirúrgica sin necesidad de tratamiento.   |
| Astrocitoma pilocítico    | I     | 5-20 años  | Crecimiento lento y no metastático. Aparición en cerebelo y tronco cerebral. Eliminación quirúrgica sin necesidad de tratamiento.  |
| Astrocitoma difuso        | II    | 20-30 años | Crecimiento lento. Posibilidad de metástasis dentro del SNC y progresión a astrocitomas de mayor grado. Aparición en lóbulo frontal y temporal.  |
| Astrocitoma anaplásico    | III   | >40 años   | Crecimiento rápido. Posibilidad de metástasis dentro del SNC. No presenta vascularización ni necrosis. Tratamiento quirúrgico suplementado con radio y quimioterapia.  |
| Glioblastoma Multiforme   | IV    | 50-70 años | Células muy indiferenciadas con alta capacidad mitótica. Presenta angiogénesis y necrosis. Posibilidad de metástasis dentro del SNC. Aparición en materia blanca subcortical del hemisferio cerebral. Tratamiento quirúrgico suplementado con radio y quimioterapia. |

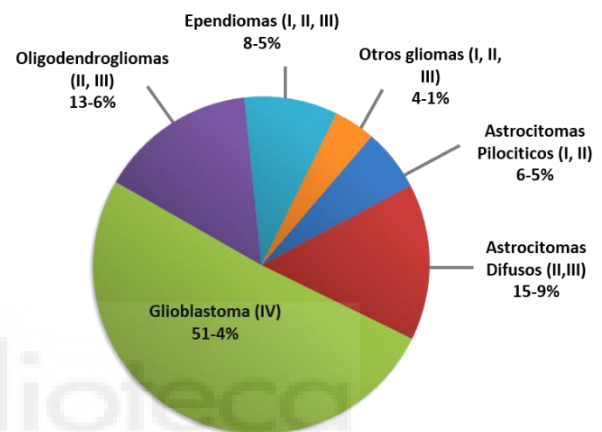
En este apartado explicamos que un solo tipo celular tiene potencial para originar muchos tipos diferentes de tumores. La complejidad en el proceso de oncogénesis se corresponde con la gran diversidad existente en los tratamientos de estos tipos de tumores y su sintomatología. Conocer detalladamente este proceso es vital para determinar los mecanismos clave que rigen este proceso y así poder atacarlos con el objetivo de obtener tratamientos eficaces para cada tipo de tumor y evitar la aparición de neoplasias secundarias más malignas.



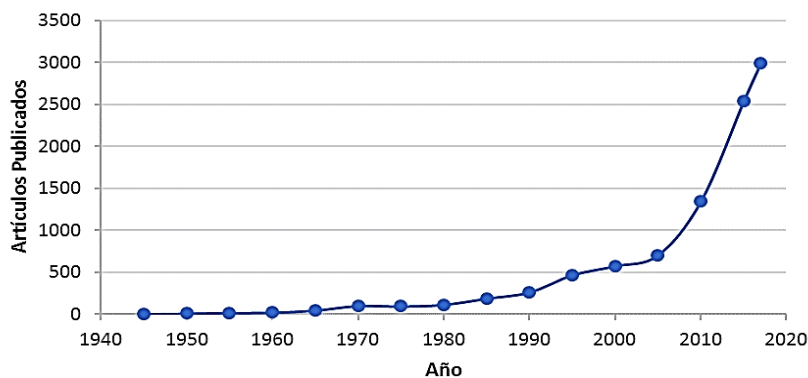
1.3. Glioblastoma Multiforme (GBM)

El término glioma fue introducido por primera vez en 1864 por el médico alemán Rudolf Virchow [9]. Fue él quien separó este tipo de tumor de otros tipos de tumores del sistema nervioso y clasificó los diferentes tipos de gliomas en gliomas de alto y bajo grado. Sin embargo, lo que hoy conocemos como la primera clasificación de gliomas, y de la cual deriva nuestra clasificación actual, fue llevada a cabo por los neurocirujanos Percival Bailey y Harvey Cushing en 1926 [10], [11]. Esta clasificación acuña por primera vez el término Glioblastoma Multiforme (GBM).

El GBM es el tipo de tumor del SNC más común y maligno en adultos [5], [12]. Como se observa en la **Figura 1** supone el 50% de los tumores del SNC [13], y está considerado por la OMS como un astrocitoma de grado IV [14]. A pesar de haberse descrito por primera vez a inicios del siglo pasado, actualmente presenta una supervivencia media aproximada de 15 meses tras el diagnóstico. Como se observa en la **Figura 2**, en los últimos años se están dedicando una gran cantidad de recursos, económicos y humanos, en investigar cuales son las causas de la gliomagénesis, identificar las alteraciones genéticas que dan lugar su fenotipo maligno y, por supuesto, a encontrar un tratamiento efectivo para este tumor.



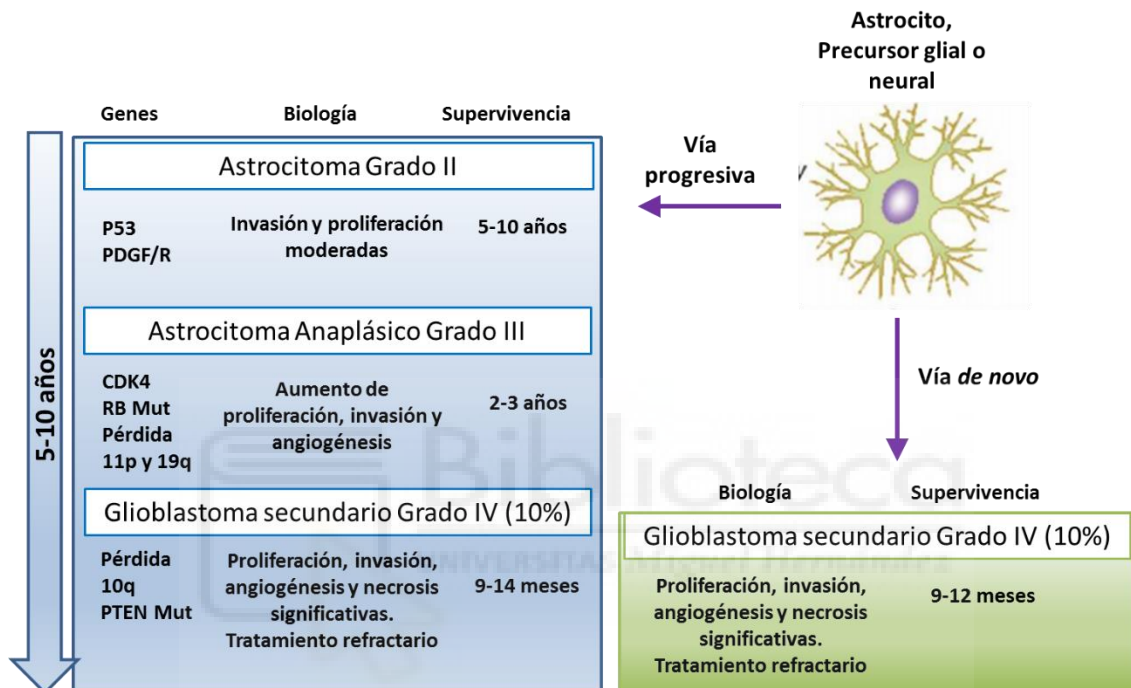
**Figura 1: Frecuencias de gliomas según la OMS.** Los grados de cada glioma se muestran entre paréntesis. Imagen Modificada de [12].



**Figura 2: Número de artículos científicos sobre glioblastoma publicados por año en las últimas décadas.** Se utilizó el buscador bibliográfico PUBMED para recuperar los artículos científicos que contienen el término "Glioblastoma Multiforme". Imagen propia

## 1. Introducción

En aproximadamente en el 90% de los casos, el GBM aparece como consecuencia directa de mutaciones en genes que regulan el ciclo celular o la proliferación. En estos casos se considera que el GBM se ha formado *Vía de novo*. Sin embargo, alrededor del 10% de los GBM diagnosticados, provienen de un astrocitoma difuso de grado II o anaplásico de grado III que ha progresado a un GBM por medio de una Vía Progresiva. Como muestra la **Figura 3** los astrocitomas de menor grado pueden acumular mutaciones con el tiempo que aumentan su malignidad, convirtiéndose finalmente en un tumor de mayor grado [15].



**Figura 3: Vías de desarrollo de Glioblastoma.** Los glioblastomas secundarios derivan de astrocitomas de menor grado. Con el tiempo, estos tumores aumentan su malignidad y su resistencia a terapia convirtiéndose en Glioblastoma Secundario [14]. Imagen Propia

### 1.3.1. Epidemiología

El GBM presenta una incidencia de 4-6 nuevos casos por cada 100.000 habitantes. Al igual que se comentó en el apartado *1.1 Cáncer: enfermedad y problema social*, se espera que la incidencia del cáncer, y en consecuencia del GBM, siga una tendencia ascendente debido al envejecimiento de la población. A pesar de que puede aparecer en cualquier rango de edad, es más frecuente a partir de los 64 años y presenta una mayor incidencia en hombres que en mujeres [8].

### 1.3.2. Etiología

Las neoplasias malignas como el GBM son el resultado de múltiples alteraciones genéticas secuenciales y acumulativas que aparecen a consecuencia de factores intrínsecos y ambientales [16]. Entre los factores genéticos que puedan dar lugar a la aparición del GBM encontramos mutaciones esporádicas en protooncogenes y genes supresores de tumores; alteraciones cromosómicas y una cierta predisposición genética a padecer esta enfermedad [7]. Se han descrito síndromes genéticos que aumentan la probabilidad de aparición de GBM, los más conocidos son el Síndrome de Li-Fraumeni (mutación en el gen supresor de tumores *p53*), Síndrome de Turcot (se caracteriza por una predisposición hereditaria al desarrollo de neoplasias malignas en el SNC) y Neurofibromatosis 1 y 2 [13]. Sin embargo, también hay ciertos factores de riesgo ambientales que pueden desencadenar la aparición de la enfermedad. Entre los factores ambientales más comunes encontramos los virus oncogénicos o SIDA; exposición a mutágenos, especies reactivas del oxígeno (ROS) y radiación ionizante.

### 1.3.3. Síntomas

El GBM se desarrolla tan rápido que la mayoría de los pacientes comienzan a desarrollar una historia clínica a los pocos días o semanas de aparecer el tumor. En el apartado de 1.2. *Tumores del Sistema Nervioso Central*, se indica que los síntomas que presenta el tumor varían en función de la localización anatómica en la que se desarrolle el tumor. El cuadro clínico de síntomas que presenta el paciente sirve para dar información sobre la situación anatómica del tumor.

Los síntomas más comunes del GBM incluyen convulsiones, cambios cognitivos, cambios en la personalidad y el estado de ánimo, afasia, hemiparesia y alteraciones visuales. El aumento de la presión ejercida por el tumor en el resto del encéfalo provoca *efecto masa*, y ocasiona síntomas generales como náuseas, vómitos o dolor de cabeza. En ocasiones, se retrasa el diagnóstico de la enfermedad, y en consecuencia su tratamiento, ya que las dificultades cognitivas y los cambios de personalidad pueden ser confundidos con síntomas de demencia o desórdenes psíquicos [13], [16].

Ante la aparición de la sospecha de que el paciente pudiera padecer GBM se debe establecer un protocolo de actuación lo más rápido posible.

### 1.3.4. Diagnóstico: Imagen de Resonancia Magnética

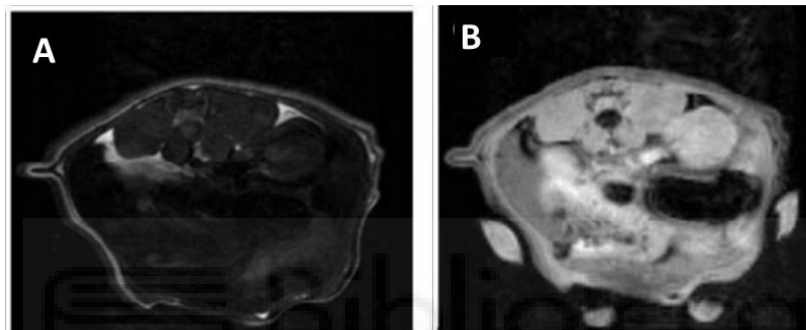
El GBM se caracteriza por presentar una evolución muy rápida, por ello el diagnóstico precoz es un factor determinante para el pronóstico de la enfermedad. El tratamiento temprano del GBM puede aumentar varios meses la vida del paciente, un incremento significativo teniendo en cuenta que la esperanza de vida media de los pacientes afectados se sitúa en torno a los 15 meses.

La primera aproximación en el diagnóstico se realiza mediante técnicas de imagen. En estos casos la técnica más extendida es la Imagen por Resonancia Magnética (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI), ya que es una herramienta muy potente, no invasiva y no radioactiva, que puede proporcionar información muy precisa sobre el tamaño y la localización del tumor [17]. MRI genera un campo magnético empleando un imán de gran tamaño y ondas de radio. De esta manera, se provoca la excitación de los núcleos de hidrógeno en las moléculas de agua presente en los tejidos del organismo, haciendo que se alineen entre ellos. Cuando se interrumpe el pulso de radiación electromagnética los núcleos de hidrógeno regresan a su estado de equilibrio inicial liberando energía en forma de ondas. Este tiempo de retorno es diferente para cada tejido y se recoge por el escáner de la máquina de MRI para hacer la reconstrucción de la imagen radiológica. En la MRI, la intensidad de la señal es dependiente de diversos factores, como la densidad de núcleos de hidrogeno, el tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y transversal ( $T_2$ ) y las características que definan el microambiente tisular, como el pH y la oxigenación del tejido. El conjunto de todos estos factores son los que permiten ver diferencias de contraste entre los diferentes órganos y estructuras. Sin embargo, en muchas ocasiones el contraste intrínseco del organismo es limitado y no permite realizar un diagnóstico sensible y preciso. La administración de agentes de contraste (AC) para MRI evitan este problema y mejoran la resolución de la imagen.

Los AC se clasifican en tipo  $T_1$  y  $T_2$  en función de su actividad de relajación tras la interrupción del pulso de radiofrecuencia. Los AC tipo  $T_1$  presentan una relajación longitudinal al campo magnético, es decir en el eje Z. Todos los AC de MRI para  $T_1$  aprobados en clínica poseen una estructura molecular basada en derivados de Gadolinio  $^{3+}$  ( $Gd^{3+}$ ), ya que este elemento presenta una fuerte actividad paramagnética [18]. La relajación de los núcleos en los AC del grupo  $T_2$  es perpendicular al campo magnético, en los ejes X e Y. Los AC de este grupo usados clínicamente están basados en nanopartículas de óxido de hierro, un compuesto superparamagnético [19].

## 1. Introducción

Podremos obtener diferentes tipos de información del tejido en función de si la imagen es adquirida mediante una secuencia  $T_1$  o  $T_2$ . El tiempo de relajación del agua y los líquidos es muy largo en la secuencia  $T_2$ , de modo que en la imagen aparecen de color blanco brillante, como se puede observar en la **Figura 4-A**. Esta secuencia es muy útil para detectar procesos patológicos como tumores o hemorragias, ya que suelen acumular agua. Sin embargo, es difícil realizar un diagnóstico empleando esta secuencia ya que la imagen de muchos de los órganos se representa en tonos de gris oscuro y negro. Por el contrario, la **Figura 4-B** muestra que en la secuencia  $T_1$  el agua y los líquidos suelen mostrarse de color negro. Mientras que los órganos se ven en una escala de color entre blanco y gris que, en este caso, sí permite observar correctamente su morfología [20].

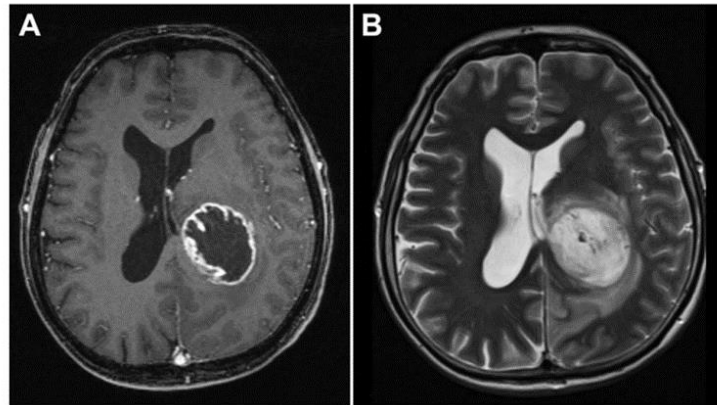


**Figura 4:** Imagen de MRI de sección coronal de estómago y riñones de rata. **A)** Imagen de secuencia  $T_2$  en la que aparecen los órganos en tono negro y gris oscuro. **B)** Imagen de secuencia  $T_1$  donde se muestra los órganos en tonos grises y blancos. Imagen modificada [19]

Actualmente se está apostando por el diseño de nuevos AC duales que sean capaces de actuar en  $T_1$  y  $T_2$ , aportando información complementaria en ambas secuencias. Esta estrategia sería muy útil en tejidos con tiempos de relajación moderados, como el hígado, el riñón o tejido cerebral [21]. Hay estudios donde se han sintetizado moléculas que cumplen estas características combinando Gd y Fe. Pero, generalmente, son tóxicas en el organismo y liberan los iones de Gd y Fe ya que tienen una baja solubilidad en el medio acuoso y en el pH fisiológico. También es usual que se origine un acoplamiento magnético entre las estructuras  $T_1$  y  $T_2$  que produzca apantallamiento entre ambas señales [22].

Este nuevo tipo de AC duales podría mejorar la resolución del diagnóstico de muchos tipos de tumores, como el GBM que tiende a aparecer en la materia blanca subcortical, que presenta tiempos de relajación moderados. En este tumor, un diagnóstico detallado y preciso puede llegar a suponer una mejora muy relevante en el pronóstico del paciente.

En este trabajo se plantea el uso de un nuevo AC dual  $T_1$ - $T_2$  que permita perfeccionar el diagnóstico del cáncer en general y del GBM en particular, véase 1.5 *Propuesta de AC de Imagen de Resonancia Magnética dual para  $T_1$ - $T_2$* .



**Figura 5: MRI típico de paciente con glioblastoma. A)** Imagen en secuencia T<sub>1</sub> de glioblastoma con centro necrótico (en negro) y tejido tumoral hiperintenso (blanco). **B)** Imagen en secuencia T<sub>2</sub> que revela señal hiperintensa blanca en la zona del tumor y la zona adyacente de la materia blanca, indicativo de la extensión del tumor y del edema. Imagen tomada de [13].

Como se observa en la **Figura 5-B**, el GBM aparece en la MRI de secuencia T<sub>2</sub> como una masa blanca debido a la acumulación de agua en la zona tumoral, mientras que la materia blanca aparece en tonos grisáceos. La MRI también proporciona información sobre las características morfológicas del tumor. La zona ventricular se representa en blanco por la presencia de líquido cefalorraquídeo. En la **Figura 5-A** se observa que el centro del tumor se representa de color negro en la MRI, indicativo de la presencia de necrosis, mientras que la zona externa del tumor se muestra de blanco. Esta formación recibe el nombre de tumor en forma de anillo y es frecuente en estadios más avanzados del GBM. En este caso la zona ventricular se representa de color gris oscuro o negro [13].

Hay ciertos casos en los cuales la MRI no está recomendada o no se puede, por ejemplo, en pacientes claustrofóbicos o con marcapasos. Cuando la MRI está contraindicada se realiza un scanner TAC (Tomografía Axial Computarizada) o PET (Positron Emission Tomography). Esta técnica emplea trazadores radioactivos como la <sup>18</sup>F-Fluorodesoxiglucosa (FdG) para localizar el tumor. El PET presenta una sensibilidad muy alta, haciéndola muy útil para detectar los casos de recurrencia o restos aislados del GBM. No obstante, su empleo está restringido por el uso de isótopos radiactivos [23].

Una vez se ha confirmado la presencia del GBM, se debe proceder a su caracterización genética y molecular, para conocer su nivel de agresividad y predecir la respuesta a terapia. Para ello se recoge una biopsia de tejido tumoral durante la cirugía de resección del GBM. Este es el primer paso en el tratamiento de este tumor ya que elimina o disminuye los síntomas ocasionados por el efecto masa. La caracterización molecular suele realizarse mediante la detección inmunohistoquímica de marcadores tumorales característicos del GBM como el GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) o proteínas típicas de proliferación celular. Durante el curso de la

cirugía se van recogiendo sucesivas biopsias del tejido tumoral en las cuales se van realizando pruebas de diagnóstico para definir el área ocupada por el tumor y poder extirpar el mayor porcentaje posible de tumor y retrasar la aparición de recurrencia, minimizando al mismo tiempo el posible daño al resto de tejido cortical sano. A pesar de este procedimiento, el comportamiento difuso de este tumor le permite infiltrarse en el resto del tejido cortical sano. Esto impide la resección completa del tumor por cirugía, haciendo necesaria la quimiorradioterapia. En ciertas ocasiones, la cirugía también se utiliza para implantar el tratamiento quimioterapéutico encapsulado en obleas que van liberando el fármaco de forma lenta y controlada [24].

### 1.3.5. Características histológicas

La OMS define el GBM como una neoplasia anaplásica de la glía compuesta por células tumorales originarias de astrocitos. Con tendencia a aparecer en la materia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales. Histológicamente se representa por poseer una elevada densidad celular causada por la alta actividad mitótica. Generalmente, el tumor presenta un centro necrótico y un alto grado de vascularización. En el transcurso de la tumorigénesis temprana se originan zonas hipóxicas mal comunicadas con los vasos sanguíneos. Las células de las zonas hipóxicas expresan factores inductores de proliferación endotelial, para aumentar la vasculatura del tumor y permitir un suministro adecuado de O<sub>2</sub> y nutrientes. Contribuyendo a un fenotipo más maligno del tumor [7]. Sin embargo, llega un determinado momento en el proceso de tumorigénesis del GBM en el que el ritmo del crecimiento celular no se contrarresta con la velocidad de vascularización del tejido. Esta situación provoca la privación de nutrientes y de O<sub>2</sub> en la zona central del tumor, ocasionando el núcleo necrótico característico del GBM [23], [24]. La zona necrótica está rodeada de células en pseudoempalizada, generando la forma en anillo del GBM.

El término multiforme de este tumor es atribuido a la apariencia pleomórfica de las células que lo componen, que además presentan una morfología muy indiferenciada denominada anaplasia. Sin embargo, a pesar del alto grado de indiferenciación celular, es común que las células cancerígenas sigan conservando ciertas cualidades de las células de origen. Las células de GBM mantienen la capacidad migratoria que poseen los astrocitos, que deben migrar durante el desarrollo neural para servir de soporte a las nuevas neuronas [25]. Esta capacidad migratoria de las células de GBM es uno de los factores que hacen que este tumor sea altamente invasivo. Permite a las células cancerígenas metastatizar a otras zonas del SNC, por lo general

tienen tendencia a migrar a otros puntos del hemisferio contralateral desplazándose a través del cuerpo caloso.

Las células del GBM poseen aberraciones cromosómicas que suelen ir en aumento a lo largo de la enfermedad. Causando grandes variaciones entre los núcleos de las células o generar, incluso células plurinucleadas [26]. Estas aberraciones son el resultado de los errores genómicos que suelen ir acumulando las células cancerígenas en la segregación cromosómica a lo largo del transcurso de la enfermedad.

Finalmente, en lo que se refiere al microentorno tumoral. El lactato secretado por las células cancerígenas tras la glicolisis anaerobia provoca la disminución del pH en el ambiente extracelular. La acidificación del ambiente favorece el crecimiento del tumor ya que ocasiona la inmunosupresión de la zona tumoral [27]. Aportando una ventaja selectiva a las células del GBM frente a las células vecinas no tumorales.

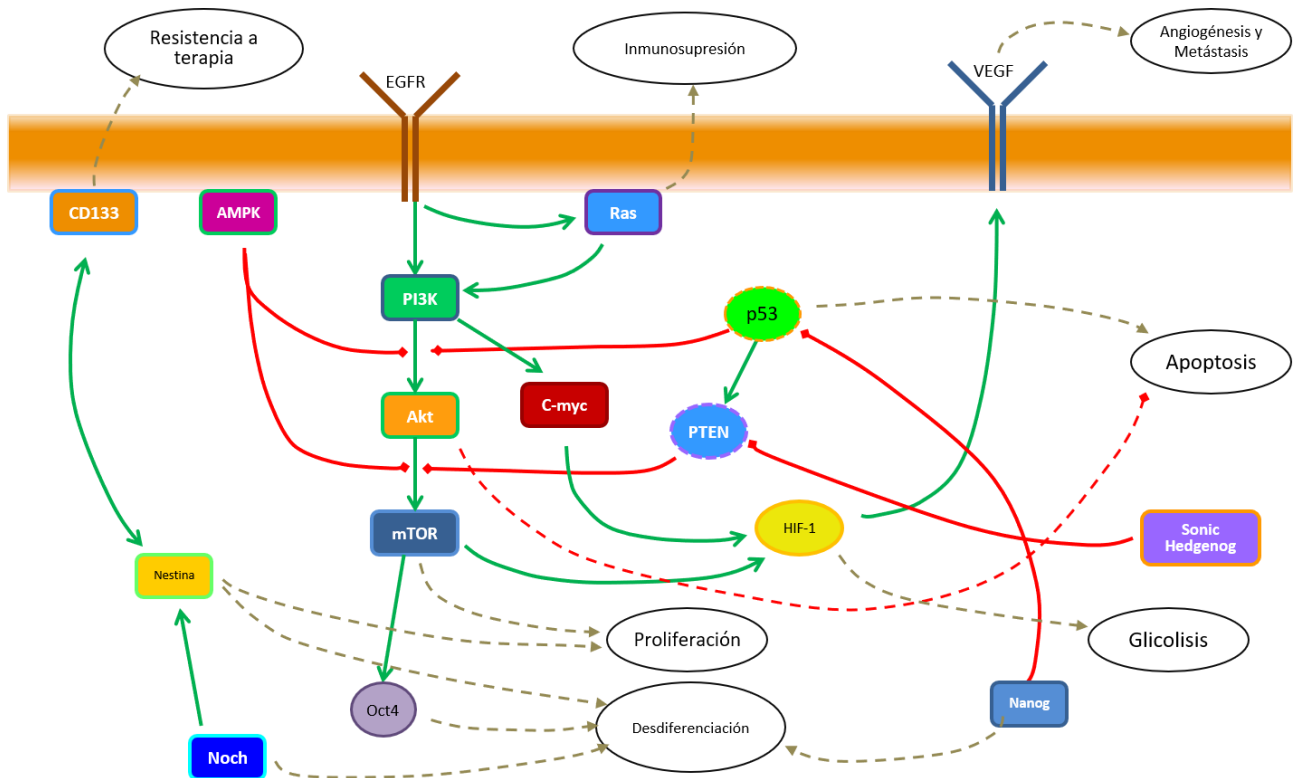
### 1.3.6. Regulación génica del Glioblastoma Multiforme

El proceso de tumorigénesis en el GBM es muy complejo y están implicados una gran diversidad de factores que incluyen la acumulación de lesiones genéticas que confieren al tumor la capacidad de crecer muy rápido. Para entender la agresividad del GBM es imprescindible explicar los cambios ocurridos a nivel de la expresión génica. Estas variaciones afectan principalmente a genes implicados en la proliferación, el ciclo celular, la diferenciación, la angiogénesis y el metabolismo. Los cambios en la expresión génica pueden aparecer por alteraciones en factores de transcripción, mi-RNA, regulación epigenética o mutaciones que alteren la secuencia génica del gen implicado. En este apartado nos centraremos en explicar solamente algunos de los cambios más comunes y característicos en la expresión génica del GBM. Sin embargo, para comprender por qué el GBM presenta un grado tan elevado de agresividad y tiene una predisposición tan alta de resistencia a terapia, es importante tener en cuenta que puede llegar a haber una gran variación entre el perfil génico de un paciente de GBM y otro. Incluso hay diferencias en el perfil génico entre las diferentes células que conforman GBM en un individuo, generadas por las diferencias en el microambiente del tumor.

En la **Figura 6** se muestra un resumen de algunas de las interacciones de los principales genes implicados en el proceso de tumorigénesis del GBM. Es frecuente que estos genes estén implicados en cascadas de transducción de señales que, finalmente, medie en la transcripción de genes relacionados con angiogénesis, metástasis, desdiferenciación o ciclo celular.



## 1. Introducción



**Figura 6: Principales alteraciones en rutas de señalización celular implicadas en el proceso de oncogénesis del GBM.** Las rutas activadas se marcan en verde y las reprimidas se encuentran en rojo. Los elementos reprimidos en GBM se indican con línea discontinua (AMPK, P53, PTEN). Las líneas discontinuas señalan efectos directos en la célula. Imagen propia basada en [13], [28], [29].

La expresión de los genes supresores de tumores, como PTEN o *p53*, suelen encontrarse reprimida en cáncer. Este silenciamiento puede ser por metilación del promotor, mutaciones, deleciones cromosómicas o por factores sobreexpresados en GBM como Nanog. Por ejemplo, en muchos casos de GBM existe una pérdida total o parcial en el cromosoma 10, que es el cromosoma donde se encuentra el gen codificante para PTEN (fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato 3-fosfatasa) [30]. La represión o el silenciamiento de los genes supresores de tumores *p53* y PTEN desencadena la activación de forma constitutiva de la ruta PI3K- Akt- mTOR. Esta ruta activa la proliferación celular y, de forma también constitutiva, HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia Inducible Factor-1*). Este factor juega un papel muy importante en el desarrollo tumoral ya que activa la expresión de genes implicados en angiogénesis, como por ejemplo VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), metástasis y metabolismo glucolítico en las células cancerígenas.

Una de las alteraciones genéticas más conservadas en el GBM es la sobreexpresión de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), que se encuentra presente en el 60% de los casos. Esta sobreexpresión es el resultado de varios factores. El gen codificante para EGFR se encuentra en el cromosoma 7, que suele ser polisómico en GBM. El cual además se encuentra en una región cromosómica con tendencia a duplicarse durante la enfermedad. Esta amplificación suele ir

acompañada de una mutación que activa de forma constitutiva el dominio del receptor extracelular. Todo ello le permite mantener activada continuamente la ruta de PI3K y, por otro lado, secretar factores angiogénicos, aumentando la tumorigenicidad [28]. Las células del GBM que presenten una mayor activación constitutiva de EGFR poseerán una ventaja selectiva frente al resto de las células del tumor que posean menor actividad en este receptor. Una mayor actividad de EGFR otorga a las células una mayor capacidad de división celular, resistencia a terapias e inhibición de la apoptosis [29].

La sobreexpresión de componentes de vías de señalización propias del desarrollo neural temprano también es típica en el GBM. Entre estos factores de desarrollo relevantes en la evolución del GBM debemos destacar Nanog, Noch y Sonic Hedgehog. Los cuales provocan que el astrocito diferenciado que origina el GBM se desdiferencie en precursores neurales que tienen una elevada capacidad proliferativa [31]. La vía Noch activa la expresión de Nestina, una proteína citoesquelética característica de células madre neurales, la cual es sobreexpresada junto con proteínas implicadas en la resistencia a terapia. La expresión de estos factores, y especialmente de Nestina, están relacionados con un peor pronóstico para el paciente de GBM [32], [33].

Un alto porcentaje de casos de GBM presentan desfosforilación en la proteína de Retinoblastoma (Rb), que tiene un papel muy importante en la regulación del ciclo celular. Está implicada en la activación de ciclo celular para que la célula salga de fase no proliferativa G1 y comience la fase de síntesis de DNA, es decir, la fase S. Cuando Rb se encuentra en estado fosforilado se arresta el ciclo celular, ya que esta fosforilación impide la transcripción de ciclinas. Sin embargo, en estado hipofosforilado, como ocurre en el GBM, se induce la expresión y la actividad de las ciclinas, activando el ciclo celular y la división de las células cancerígenas.

Como hemos comentado anteriormente, el perfil de expresión genética no se rige únicamente por factores proteicos. Los factores no proteicos también juegan un papel muy importante en la regulación génica del GBM, y por tanto en el pronóstico de la enfermedad. La regulación génica también está gobernada por cambios epigenéticos, mi-RNA y modificaciones post-traduccionales.

La tumorigénesis en las células cancerígenas está favorecida en gran parte por modificaciones epigenéticas [34]. En las células de GBM solemos encontrar hipometiladas las regiones codificantes para genes relacionados con la proliferación. Mientras que, como queda resumido en la **Tabla 4**, las zonas relacionadas con genes supresores de tumores suelen hallarse hipermetiladas [34]–[36].

**Tabla 4: Modificaciones epigenéticas implicadas en la aparición del GBM**

| Elemento                                    | Modificación    | Efecto/Consecuencia  |
|---|-----------------|--|
| Genes supresores de tumores: PTEN, P53 y RB | Hipermetilación | Activación de la proliferación celular.<br>Interrupción de la apoptosis        |
| MGMT  | Hipermetilación | Fallo en la protección y reparación de DNA.<br>Favorece fenotipo hipermutador. |
| VHL (Von Hippel-Lindau)                     | Hipermetilación | Evita la degradación de HIF-1  |
| Caspasa-8                                   | Hipermetilación | Interrupción de la apoptosis   |
| MMP9  | Hipometilación  | Favorece metástasis  |

Entre los genes presentes en la **Tabla 4** debemos destacar la importancia que tiene el estado de metilación de MGMT ( $O^6$ Metilguanina-DNA-Metiltransferasa) en el tratamiento de GBM. Este gen codifica para un enzima reparador de DNA que protege frente a la acción de agentes alquilantes como la Temozolomida (TMZ), el anticancerígeno más extendido actualmente para tratar el GBM. La hipometilación de MGMT otorga a las células de GBM resistencia contra este fármaco, ya que el enzima codificado por este gen repara el daño que ocasiona este fármaco en las hebras de DNA [28].

Un campo que está siendo muy estudiado en la actualidad por su gran potencial en el desarrollo de nuevos fármacos y su importancia en el proceso de tumorigénesis, es la regulación genética mediante mi-RNA. Se ha identificado que, como resultado de la alteración de la actividad de oncogenes y genes supresores de tumores, el perfil de expresión de mi-RNA es aberrante en las células de GBM.

La **Tabla 5** muestra las dianas de algunos mi-RNAs importantes en el desarrollo y la aparición de GBM. En los astrocitos, al igual que en los demás tipos de células del organismo, la expresión de los mi-RNA debe estar muy regulada para asegurar el buen funcionamiento celular y evitar procesos tumorales por una proliferación desregulada. Sin embargo, en las células tumorales es común que exista desregulación en el perfil de expresión de mi-RNA, inhibiéndose o aumentándose su nivel de expresión, o que adquieran mutaciones puntuales ya que suelen encontrarse en zonas inestables del genoma. Su desregulación propicia la división celular, el metabolismo tumoral y la metástasis.

**Tabla 5: Desregulaciones en la expresión de mi-RNA típicas en la aparición de GBM**

| mi-RNA   | Regulación     | Diana y Efecto  |
|----------|----------------|---|
| mi-R10b  | Sobreexpresado | p53. Inhibición de apoptosis y desregulación de ciclo celular |
| mi-R26a  | Sobreexpresado | Inhibe diferenciación celular                                 |
| mi-R7    | Silenciado     | K-Ras, c-Myc, EGFR. Sobreexpresión de oncogenes.              |
| mi-R34a  | Silenciado     | p53. Inhibe apoptosis y desregulación ciclo celular           |
| mi-R195  | Sobreexpresado | Resistencia a Temozolomida                                    |
| mi-R181a | Sobreexpresado | Resistencia a radioterapia                                    |

Entre las alteraciones genéticas relevantes para el crecimiento del tumor, los cambios que ocurren en el metabolismo tumoral y en las rutas de biosíntesis tienen un papel muy relevante. Confieren al tumor la capacidad de aumentar su anabolismo y su captación de nutrientes. Como se comentó anteriormente, la activación de EGFR conlleva la activación de PI3K, el cual está implicado en la activación del denominado Efecto Warburg y el aumento del metabolismo tumoral y la biosíntesis [37]. En lo referente a alteraciones metabólicas en el GBM, la más característica es la mutación de la Isocitrato Deshidrogenasa (IDH 1 y 2). Este enzima forma parte del ciclo del ácido cítrico, y se piensa que puede tener relación con el proceso de tumorigénesis [38]. El 80% de los casos de GBM presentan una mutación puntual en R132H, una arginina presente en el centro activo del enzima, provocando un fallo en su funcionamiento. Esta mutación hace que el enzima genere una nueva función catalítica que es perjudicial en la célula. Cuando IDH presenta la mutación en R132H deja de transformar  $\alpha$ -ketoglutarato, en su lugar origina un nuevo sustrato llamado 2-hidroxiglutámico (2HG), en una reacción que consume NADP, en lugar de sintetizarlo. Este compuesto está considerado un oncometabolito por los efectos perjudiciales que tiene en el organismo. En primer lugar, actúa como inhibidor de algunas desmetilasas de DNA, alterando la regulación de la expresión génica en las células de GBM. Se cree que esto puede contribuir a la tumorigénesis ya que impide la diferenciación celular y altera la expresión de ciertos factores de crecimiento [39]. Respecto las alteraciones en las rutas biosintéticas en el GBM, una de las más características es la sobreactivación de la ruta de biosíntesis de protoporfirinas (*Sección: 1.8 Ruta biosíntesis de porfirinas y hemos: 5ALA*). Las alteraciones en rutas metabólicas y de biosíntesis que adquieren las células de GBM durante su evolución son objeto de estudio para el diseño de nuevas terapias ya que permiten una rápida proliferación celular y afectan al epigenoma del GBM aumentando su agresividad.

Es muy importante resaltar el amplio espectro de mutaciones y alteraciones genéticas y genómicas que puede existir en entre los distintos pacientes afectados por el GBM. En este apartado, sólo hemos hecho un breve resumen de algunas de las más relevantes y comunes. Pero hay otras muchas alteraciones menos frecuentes que presentan un papel importante en el nivel de agresividad del GBM, pudiendo llegar a ser muy malignas para el individuo. Así mismo, debemos ser conscientes de que todavía desconocemos muchas alteraciones y que debemos seguir investigándolas y caracterizándolas para conocer bien a qué nos enfrentamos. Por todo esto, la gran diversidad genómica y transcriptómica que presenta el GBM, así como su naturaleza infiltrativa, hacen que sea uno de los tumores más difíciles de tratar y con mayor resistencia a terapias.

### 1.3.7. *Tratamiento del Glioblastoma Multiforme en la actualidad*

En los últimos años se han realizado importantes avances en el tratamiento del cáncer. En muchos tipos de tumores se ha conseguido aumentar de forma muy significativa la esperanza y la calidad de vida del paciente. Incluso, se ha logrado curar algunos tipos de tumores. Sin embargo, a pesar de estos avances, el GBM continúa siendo un tumor con una esperanza de vida muy corta. La naturaleza infiltrativa y la maquinaria para generar resistencia a terapia que caracterizan al GBM, junto con la protección que le aporta la barrera hematoencefálica (*Sección: 1.4 Barrera Hematoencefálica*) dificulta enormemente su tratamiento.

Actualmente, la forma más común de combatir el GBM es mediante un tratamiento combinado que consta de cirugía, quimioterapia y radioterapia. Como se ha explicado en la *Sección 1.3.4 Diagnóstico: Imagen de Resonancia Magnética*, cuando el tumor se ha diagnosticado y localizado por medio de MRI, se extirpa mediante cirugía. Esto permite una citorreducción de la masa tumoral y, en consecuencia, la disminución de los síntomas ocasionados por el efecto masa que genera el tumor. Para eliminar el mayor porcentaje posible de masa tumoral se utiliza un marcaje fluorescente que facilita la locación del GBM durante la cirugía. Para ello se administra 5-aminolevulínico (5ALA) de forma intravenosa al paciente, que es el precursor metabólico de la Protoporfirina IX (PpIX), (*Sección: 1.8 Ruta biosíntesis de porfirinas y hemos: 5ALA*). Las células de GBM presentan un consumo muy elevado de 5ALA, ya que la ruta de las protoporfirinas se encuentra hiperactiva en este tipo de tumor. Una de las moléculas sintetizadas a partir de esta ruta, la PpIX, es una molécula que presenta fluorescencia bajo luz azul ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 375\text{nm}/635$ ). La cual se acumula en las células tumorales permitiendo su visualización durante el proceso de resección [40].

## 1. Introducción

No obstante, la cirugía no consigue eliminar el tumor completamente debido a su naturaleza infiltrativa. Por ello, después de la cirugía es necesario complementar el tratamiento con quimioterapia y radioterapia, que comienza a administrarse tras varias semanas de la cirugía [13]. Desde el año 2005, se suele tratar a casi todos los pacientes afectados por GBM con el conocido como Protocolo de Stupp [41], que combina la cirugía con radioterapia y tratamiento con Temozolomida (TMZ). Éste es el quimioterapéutico más extendido en el tratamiento del GMB. Se trata de un agente alquilante con capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica. La TMZ provoca la metilación del DNA, inhibiendo la replicación. Las células de GBM con expresión de MGMT presentan resistencia a este fármaco ya que este enzima desmetila el DNA, reparando los daños ocasionados por la TMZ. En los casos en los que no se administra TMZ, se suelen emplear derivados de nitrosureas, como Carmustina o Nimustina [42]. En la actualidad, estos compuestos se utilizan en forma de obleas que se implantan durante la cirugía y se degradan de forma lenta y controlada liberando el fármaco [43]. En el año 2011 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó los campos eléctricos alternos de baja intensidad para el tratamiento del GBM [44].

Recientemente se está comenzando a cuestionar el uso de TMZ para el tratamiento de GBM. Hay estudios que defienden que puede ser perjudicial para el pronóstico del paciente, ya que se cree que tras varios ciclos con TMZ se aumenta la expresión de MGMT. Lo que enriquecería el tamaño poblacional de las *stem cells* de GBM (GSC) [45]. También se ha observado que en el 20% de los casos de GBM recurrente tratado con TMZ el genoma se encontraba hipermutado a consecuencia del tratamiento con el agente alquilante [46]. Este fenotipo hipermutado podría ejercer una presión selectiva facilitando la rápida evolución de clones con ventaja de crecimiento y resistencia a terapia [46], [47]. Por ello se está empezando a postular si el tratamiento con el agente alquilante TMZ es realmente beneficioso para el paciente o si ejerce una presión selectiva aumentando la agresividad del GBM.

A pesar de nuestro conocimiento actual y de los tratamientos sumamente agresivos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento del GBM, sólo hay un 26,5% de supervivencia a los dos años de la aparición de la enfermedad [48]. Al cabo del tiempo, todos los pacientes generan resistencia al tratamiento y desarrollan recurrencia. En estos casos, el tratamiento más utilizado es un anticuerpo antagonista de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) denominado Bevacizumab [30], en ocasiones combinado con un derivado de la camptotecina denominado Irinotecan [49], el efecto y mecanismo de actuación de este compuesto se explica en la Sección 1.7 *Camptotecina y Topoisomerasa*. Este anticuerpo, aprobado por la FDA en el

año 2009 [50] bloquea el receptor VEGF, reduciendo la angiogénesis en el tumor y restringiendo el aporte de oxígeno y nutrientes a las células tumorales, afectando al crecimiento del tumor.

Las últimas investigaciones muestran que en el GBM hay una determinada población de células, denominadas GSC que tienen una mayor capacidad de reparar el DNA que el resto de las células del GBM. También se ha descubierto que pueden adquirir un estado no proliferativo que les permite contrarrestar el efecto de los agentes citotóxicos antineoplásicos. Este descubrimiento, sumado a la ya sabida existencia de heterogeneidad celular en el GBM nos hace ver que hay zonas dentro del mismo tumor con resistencias a distintas terapias [33]. Al administrar un determinado tratamiento generaremos una presión selectiva para las células resistentes a esa terapia frente al resto de las células sensibles. Las células resistentes podrán seguir proliferando y se impondrán a las demás células sensibles a la terapia. Por esta razón, hay que caracterizar minuciosamente el tumor a nivel molecular y comprender bien los mecanismos que posee el GBM para generar resistencia a terapia.

### 1.3.8. Nuevos Tratamientos y Enfoques

Las características intrínsecas del GBM, tales como alta tasa de infiltración, invasión y proliferación y heterogeneidad celular y genética conducen al hecho de que todavía no hemos encontrado una terapia efectiva para su tratamiento. Por estas razones, es uno de los tumores más estudiados y sobre los que más terapias se desarrollan en la actualidad. Si bien, las dianas y las estrategias utilizadas en estas terapias son muy diversas, las principales áreas de estudio en este campo se centran en el uso de moléculas inhibitorias de rutas de señalización o metabólicas y la terapia génica.

En el presente, el número de ensayos clínicos y nuevas terapias experimentales es tan elevado que es imposible explicarlos todos. La lista de ensayos clínicos abiertos en la actualidad puede consultarse en las siguientes webs: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) y [www.controlled-trials.com](http://www.controlled-trials.com). Según una búsqueda realizada en servidor *Clinical Trials* en el año 2018, hay 1.246 ensayos totales registrados para esta enfermedad. De todos estos ensayos: 26 se encuentran en Fase I Temprana; 524 en Fase I, 634 en Fase II, 75 en Fase III, mientras que sólo 5 ensayos en Fase IV. Muchas de estas estrategias parecen muy prometedoras para el futuro tratamiento del GBM. Sin embargo, dadas sus características parece poco probable, a corto plazo, desarrollar una terapia completamente efectiva.

En la sección 1.3.6 *Regulación génica del Glioblastoma Multiforme* se ha explicado que hay ciertas rutas de señalización que están sobreactivadas en esta enfermedad. Una de las rutas alteradas más relevantes es la ruta de señalización EGFR/PI3K/Akt/mTOR por su papel en la

proliferación y en la inhibición de la apoptosis en las células cancerígenas de GBM. Teóricamente, la interrupción de esta ruta implicaría la suspensión de la proliferación y el metabolismo tumoral. En esta situación, la célula cancerígena debería activar su maquinaria de apoptosis o bien no proliferar. Incluso, podríamos esperar que se iniciara un proceso de diferenciación celular en el cual fuera adquiriendo un fenotipo más parecido al de sus células precursoras, es decir, los astrocitos. En base a estas suposiciones muchas de las estrategias terapéuticas están dirigidas a inhibir esta ruta en cualquiera de sus puntos [51]. EGFR parece ser un punto crítico para la supervivencia de las células de GBM, haciéndolo una diana muy interesante. Actualmente hay muchos ensayos clínicos basados en su inhibición utilizando distintas estrategias como sustancias químicas, anticuerpos y mi-RNA. Una estrategia muy utilizada son los inhibidores de tirosina quinasa, como el Dacomitinib y el Gefitinib. Los cuales se encuentran en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento del GBM [52]–[54]. La inhibición del factor EGFR, provocaría la interrupción de la cascada *downstream*, disminuyendo el crecimiento del tumor y permitiendo el inicio del proceso de apoptosis. El diseño de estrategias dirigidas hacia estos elementos típicos en las rutas de señalización de las células cancerígenas permite un tratamiento altamente selectivo contra las células del GBM. La activación de estas rutas en el resto del organismo adulto está muy regulada por la acción de factores como p53. De modo que este tipo de terapia disminuiría los posibles efectos secundarios sobre células no tumorales.

Un área que está teniendo mucho auge en los últimos años y que puede llegar a revolucionar el tratamiento de los tumores cerebrales, es la fototerapia dinámica (*Photodynamic Therapy -FTD*). Se está comenzando a investigar el efecto de este nuevo tipo de terapia en el tratamiento de diferentes tumores cerebrales, como el GBM. El principio de la FTD es la activación mediada por luz láser de un fotosensibilizador, generalmente porfirinas, acumulado selectivamente en las células tumorales. Ocasionando la muerte de las células tumorales de GBM que presentan altos niveles de fotosensibilizador. El fotosensibilizador utilizado consiste en una mezcla oligomérica de porfirinas, cuya ruta de biosíntesis se encuentra sobreactivada en el GBM (Sección: *1.8 Ruta biosíntesis de porfirinas y hemos: 5ALA*) [55].



A pesar del gran esfuerzo que se realiza en la investigación de una cura efectiva contra el GBM, sigue siendo una enfermedad muy maligna y agresiva. La complejidad del proceso de tumorigénesis y el hecho de que cada cáncer tenga un perfil genético y fenotípico único, dificulta en gran medida el diseño de terapias eficaces. Además, el tratamiento del tumor se hace especialmente complicado debido, por una parte, a la protección que le aporta la barrera hematoencefálica (Sección: *1.4 Barrera Hematoencefálica*) y, por otra parte, a la gran resistencia a terapia que presenta debido a la presencia de los transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) que bombean a terapia suministrada al exterior celular.

Para poder desarrollar una terapia que elimine el tumor, o simplemente, permita alargar la vida del paciente es esencial estudiar a fondo la biología molecular del Glioblastoma Multiforme con el fin de direccionar las terapias a dianas que sean exclusivas y vitales para este tumor, minimizando el daño al resto del tejido cerebral.

### *1.4. Barrera Hematoencefálica*

El tratamiento del Glioblastoma Multiforme se hace especialmente complicado debido a la presencia de una estructura denominada barrera hematoencefálica (BHE). Esta barrera fue descrita por primera vez en 1854 por Paul Ehrlich, premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908, quien observó que los colorantes inyectados por vía intravenosa teñían todos los órganos del cuerpo, excepto el encéfalo. Dando origen a la hipótesis del estancamiento del cerebro en el cuerpo. Esta estructura evita la llegada de microorganismos y tóxicos procedentes de la sangre al cerebro, manteniendo su homeostasis, aislándolo y protegiéndolo. Desafortunadamente también impide la entrada en el SNC de la mayoría de los fármacos diseñados contra enfermedades del SNC, dificultando enormemente su tratamiento.

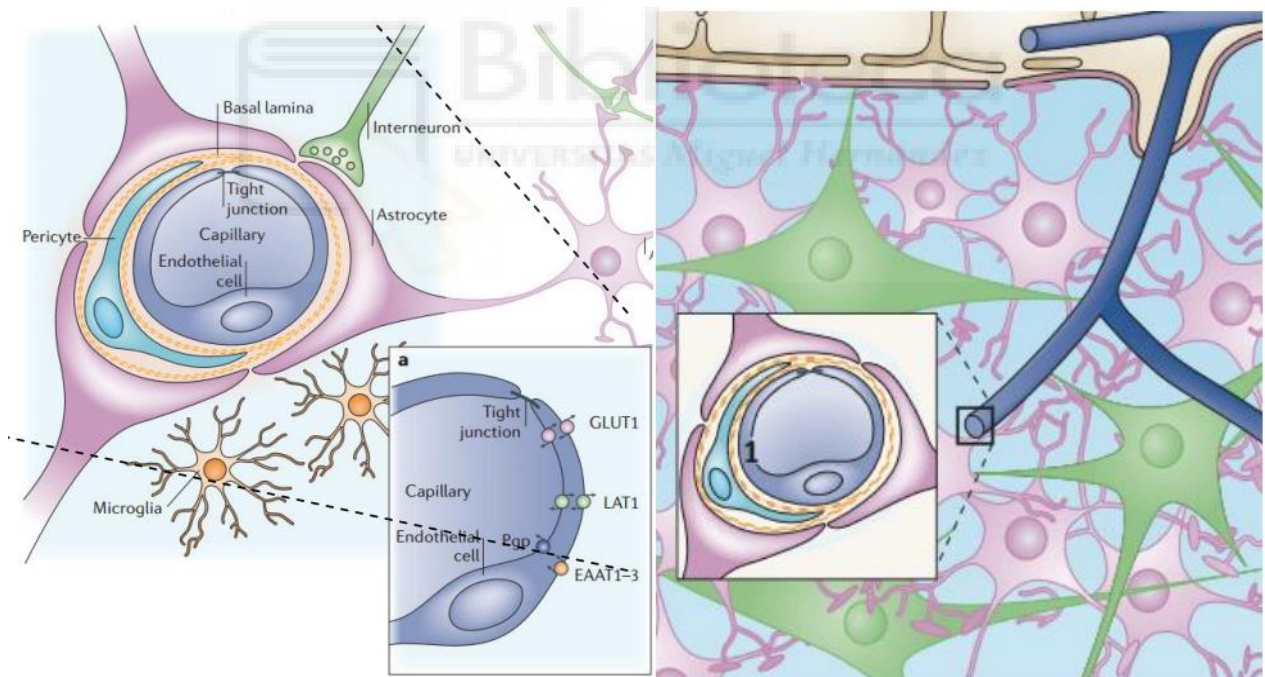
#### *1.4.1. Estructura y Función*

La función de la BHE es controlar el tráfico iónico, manteniendo, de esta manera, la ósmosis entre el cerebro y la sangre. Ayuda a separar las reservas de neurotransmisores y agentes neuroactivos que actúan en el SNC y la periferia, regulando la actividad hormonal. Sin embargo, su función principal es filtrar selectivamente los nutrientes, moléculas señalizadoras y proteínas del resto de sustancias de la corriente sanguínea, así como recoger los residuos generados en el cerebro [56]. El SNC está irrigado con una solución salina secretada por el plexo coroideo, en el propio encéfalo, que se denomina líquido cefalorraquídeo. Esta secreción envuelve el encéfalo otorgándole protección física y, por otra parte, fluye por el SNC recogiendo

## 1. Introducción

las sustancias de desecho producidas por el encéfalo y transportándolas a través de la BHE hacia la sangre.

Como se observa en la **Figura 7** la BHE se localiza a lo largo de todos los vasos sanguíneos encefálicos y está compuesta por células endoteliales, astrocitos y pericitos. El fenotipo de la BHE aparece como consecuencia de las interacciones entre los tres tipos celulares que la conforman. Las células endoteliales son diferentes de las que encontramos en el resto de los vasos sanguíneos del cuerpo. Presentan uniones fuertes entre ellas que evitan el paso de moléculas de gran peso molecular o polares [57]. Por otro lado, inducen el crecimiento y la diferenciación de los astrocitos en la BHE, los cuales, se cree que a su vez podrían mediar la inducción de las características especiales de las células endoteliales en la BHE, como la formación de las uniones fuertes que dan lugar al fenotipo de la BHE en el endotelio cerebral. Los astrocitos también son necesarios para el correcto empaquetamiento de los pericitos [58]. Todas las células que conforman la BHE son imprescindibles para su fenotipo, ya que hay sinergias en las que participan varios tipos de células.



**Figura 7: Estructura de la Barrera Hematoencefálica y organización de los tipos celulares que la componen.** La organización de estas células provoca el aislamiento del cerebro respecto al resto del cuerpo. Imagen tomada de [56]

Las células que forman la BHE están dispuestas de tal forma que se evita la formación de cavidades o aperturas que permitan la entrada de moléculas desconocidas al cerebro. Dando lugar a que el transporte de sustancias a través de la barrera hematoencefálica se encuentre muy controlado y limitado, ya que la entrada de tóxicos o patógenos al cerebro podría ser letal o

tener graves consecuencias. Las moléculas pequeñas y gaseosas, como el oxígeno, pueden difundir a través de la membrana lipídica de las células endoteliales. Esto constituye una vía de entrada para otras pequeñas moléculas lipofílicas, como el etanol. Las células endoteliales cuentan con un gran número de transportadores específicos que regulan el tráfico transcelular de moléculas hidrofílicas. Permiten y facilitan la entrada de los nutrientes necesarios para el correcto funcionamiento del cerebro, al mismo tiempo que sirve como método de exclusión y eflujo para los compuestos perjudiciales. En consecuencia, las moléculas hidrofílicas, como los péptidos y las proteínas, generalmente son excluidas, a menos que sean transferidos por receptores específicos o mediadores de la transcitosis, la cual se ve muy reducida en el endotelio cerebral [56].

A pesar de que el transporte de fármacos a través de la BHE constituye un gran obstáculo a la hora de tratar una enfermedad del SNC, como es el GBM. Sin embargo, existen ciertas patologías neuronales que causan la perturbación de las interacciones entre las células, haciéndola más o menos permeable en función de la patología [57]–[59]. Por este motivo, se debe estudiar en profundidad cómo afectan los fármacos administrados en cada caso a la integridad de la BHE, así como los cambios ocurridos en ella durante la enfermedad. El conocimiento de la regulación de la permeabilidad en la BHE y los cambios que ocurren en ella durante la enfermedad ayudará en gran medida a la hora de diseñar fármacos que puedan atravesarla y por tanto puedan servir de tratamiento en la enfermedad.

### 1.4.2. *Alteraciones de la Barrera Hematoencefálica en Glioblastoma Multiforme*

Como se ha indicado anteriormente, muchas patologías del SNC están implicadas en la perturbación de la BHE. Su compleja estructura es fruto de las interacciones entre todas las células que la conforman, siendo todas ellas igual de importantes. Está compuesta, en parte, por astrocitos, las células que originan el GBM, por lo cual, las alteraciones ocurridas en los astrocitos durante el proceso de tumorigénesis del GBM también ocasionará cambios en la estructura y función de la BHE [57].

El primer cambio que se observa es que las uniones fuertes se abren en la zona del tumor. Esto implicará una mayor permeabilidad de la barrera en este punto, permitiendo una mejor entrada de fármacos. Sin embargo, también aumenta el riesgo de entrada de tóxicos y patógenos al cerebro, así como la salida del líquido cefalorraquídeo al cerebro o de hemorragia cerebral. Esta apertura parcial se debe, por una parte, a que la división descontrolada de los astrocitos disminuye la organización en la barrera, y, por otra parte, a una desregulación en la expresión génica de las proteínas que ayudan a formar la barrera hematoencefálica.

En el GBM se observa la disminución de la expresión de la molécula de adhesión Ocludina, y prácticamente se pierde la de Claudina-1. A pesar de que estas proteínas son expresadas por las células epiteliales, la desdiferenciación astrocítica en el tumor impide la síntesis, por parte de los astrocitos, de los factores que inducen la expresión de las proteínas de unión en las células endoteliales. Rompiendo, de esta manera, la sinergia existente entre estos dos tipos celulares en condiciones normales [58]. Por otro lado, también se ha observado que la sobreexpresión en el tumor de VEGF ocasiona represión de la inducción de ocludina en la zona tumoral, aumentando la permeabilidad [58].

A pesar de que todas estas alteraciones se correlacionan con una mayor malignidad del GMB y un mayor riesgo de edema, pérdida de líquido cefalorraquídeo o accidente cerebro vascular. Lo cierto es que la apertura de la BHE facilita la entrada de fármacos en el tumor, constituyendo una ventaja en el tratamiento de esta enfermedad. Atendiendo a esta premisa y a la malignidad del GBM, en este trabajo se ha caracterizado, *in vitro* e *in vivo*, la actividad anticancerígena de un nuevo profármaco derivado de Camptotecina (CPT) aplicado al tratamiento del Glioblastoma Multiforme.

### 1.5. Propuesta de AC de Imagen de Resonancia Magnética dual para $T_1$ - $T_2$

En la Sección 1.3.4. *Diagnóstico: Imagen de Resonancia Magnética* explicamos que hay ciertos tipos de tejidos, como el tejido cerebral, que tienen tiempos de relajación moderados en  $T_1$  y  $T_2$ . Por tanto, la resolución y el detalle de las imágenes obtenidas es mejorable ya que el contraste de la imagen obtenido en estas secuencias es bajo. Los AC disponibles en la actualidad sólo permiten mejorar una de ellas, ya que no se ha conseguido unificar un AC visible en ambas secuencias. Por lo que, en estos tipos de tejidos podemos estar perdiendo información que puede ser relevante para realizar un buen diagnóstico. Un AC  $T_1$  y  $T_2$  dual solventaría este problema y permitiría mejorar la visualización de estos tejidos, en ambas secuencias.

Concretamente en el caso del GBM, un AC con estas características permitiría determinar con más exactitud los límites, las infiltraciones del tumor y las zonas afectadas por éste. Proporcionando al mismo tiempo, información complementaria sobre la estructura y la morfología del tejido cortical y del grado de afección del tejido e identificar posibles daños como edemas o hemorragias. Una herramienta con estas características ayudaría a mejorar la efectividad de la resección quirúrgica del GBM.

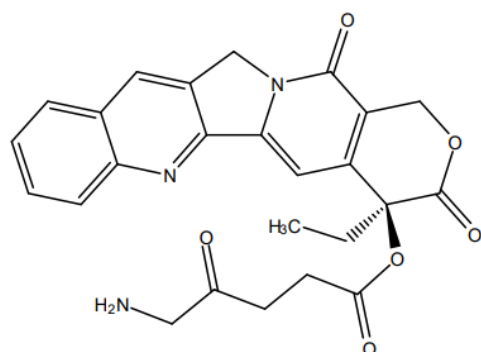
En vista de este problema, en este trabajo se ha estudiado la biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* de un nuevo AC dual  $T_1$ - $T_2$  elaborado por el Dr. Pablo Botella en el Instituto de Tecnología Química (ITQ), un centro de investigación mixto entre la Universidad Politécnica de

Valencia y el Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Se ha sintetizado un nuevo material híbrido con un análogo de Prussian Blue dopado con Gd,  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$  [20]. A diferencia de otros AC duales, en esta molécula no se produce apantallamiento entre ambas señales. Generándose un efecto de sinergia magnética entre los átomos de Fe y Gd que aumenta la señal en ambas secuencias. El campo magnético local inducido por los centros de Fe superparamagnéticos promueve el alineamiento de los *spins* de Gd en la misma dirección, resultando en un aumento del efecto de contraste en  $T_1$  [60], [61]. Para que la molécula  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$  sea estable en fluidos biológicos se ha revestido con nanopartículas de silicato polimerizado y polietilenglicol (PEG). Resultando en la nanopartícula  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ , el AC dual  $T_1$ - $T_2$  estudiando en este trabajo.

### 1.6. Propuesta de profármaco de CPT-5ALA para el tratamiento del GBM

Como hemos ido exponiendo a lo largo de todo este trabajo, hoy en día supone todo un reto diseñar fármacos que sean efectivos frente al GBM y que, además, tengan la capacidad de cruzar a través de la BHE. Los derivados de CPT son capaces de traspasar la BHE y, también cuentan con una alta actividad antineoplásica ya conocida y caracterizada. Por estas razones, se postulan como uno de los candidatos con más potencial para un futuro tratamiento efectivo del GBM.

En base a esto, en este trabajo, se propone y se caracteriza un nuevo derivado de CPT como posible tratamiento para el GBM. Este derivado consiste en un profármaco sintetizado por el Dr. Pablo Botella en el Instituto de Tecnología Química (ITQ), un centro de investigación mixto entre la Universidad Politécnica de Valencia y el Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Entendiéndose como profármaco, una forma inactiva de la CPT que se convierte a la forma activa en el organismo por reacciones enzimáticas.



**Figura 8:** Estructura química del profármaco propuesto en este trabajo para tratar el glioblastoma multiforme: la molécula **CPT-5ALA**. Imagen propia-Dr. Pablo Botella

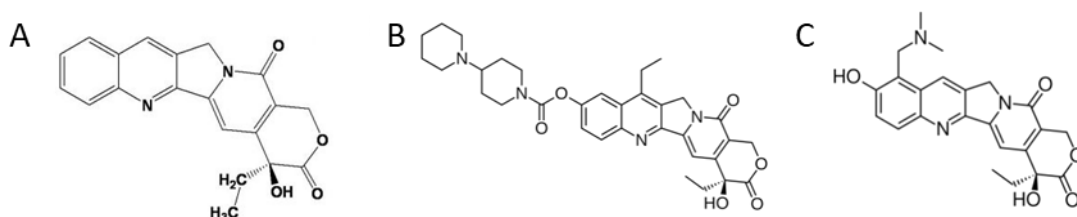
En la **Figura 8** presentamos este novedoso profármaco que está compuesto por dos moléculas que, de forma individual, tienen la capacidad de traspasar la BHE; la molécula de CPT, (Véase sección: *1.7 Camptotecina y Topoisomerasa*), unida a la molécula de Ácido 5-aminolevulínico (5ALA). Este profármaco de CPT-5ALA sería internalizado selectivamente por las células de GBM que presentan un elevado consumo de 5ALA (Sección: *1.8 Ruta de*

*biosíntesis de porfirinas y hemo:5 ALA*). Una vez en el espacio intracelular, el profármaco sería hidrolizado dando lugar a la forma libre y activa de CPT, que ejercería su actividad anticancerígena en las células en estado de fase de replicación de DNA. Si el profármaco CPT-5ALA tuviera actividad antineoplásica en los modelos de GBM, podría evitar la implantación de obleas de quimioterapéuticos en el cerebro, una estrategia muy empleada. Sustituyendo esta técnica invasiva por la administración intravenosa de la quimioterapia, mucho menos invasiva que la cirugía.

### 1.7. Camptotecina y Topoisomerasa

La Camptotecina (CPT) es un derivado de un producto natural ya caracterizado y estudiado proveniente de un árbol originario de China, *Camptotheca acuminata*. Se comenzó a estudiar en la década de los años 70, durante la cual se realizaron ensayos clínicos para analizar su actividad. Estos datos revelaron que esta molécula poseía una gran actividad anticancerígena, pero que también presentaba una solubilidad muy baja en sustancias hidrofílicas, y en consecuencia en el medio fisiológico, así como una gran reacción adversa hematológica y gastrointestinal. En vista de todas estas desventajas se comenzaron a desarrollar una gran variedad de derivados de la CPT, con el fin de solventarlas y poder aprovechar o aumentar su actividad anticancerígena.

Actualmente, los derivados de CPT más habituales en la práctica clínica son el Topotecan (Top) e Irinotecan (Iri), que fueron aprobados para su uso clínico durante la década de 1990 [62]. La estructura de los tres compuestos mencionados se puede observar en la **Figura 9**.



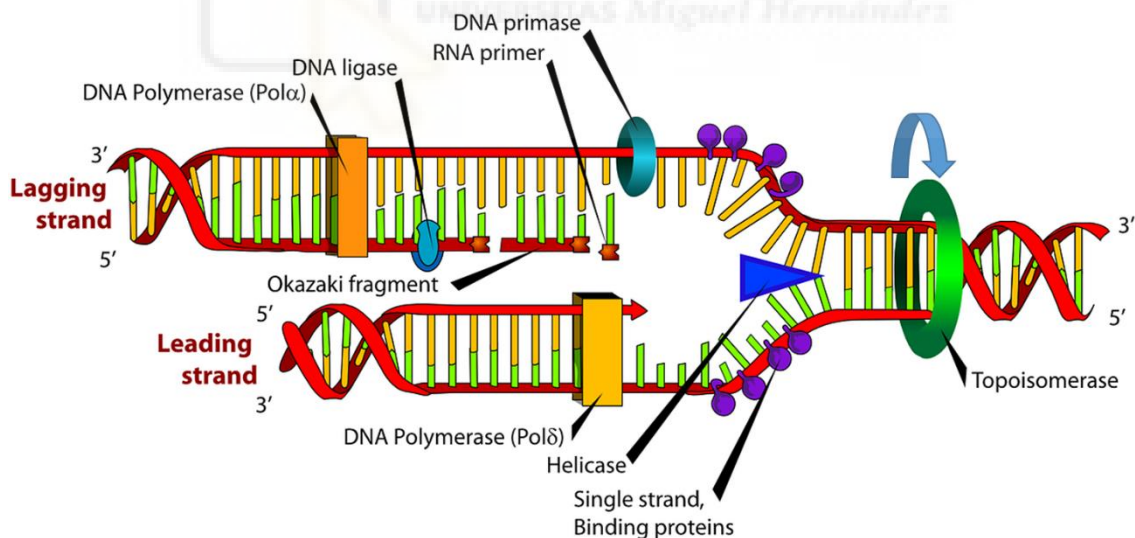
**Figura 9:** Estructura química A) Camptotecina B) Topotecan C) Irinotecan Imagen modificada basada en [62]

Debido a su alto poder anticancerígeno, su uso está muy generalizado para el tratamiento de un amplio espectro de tumores [63]. El Top se utiliza generalmente para el tratamiento de cáncer de ovario [64], de cervix y cáncer de pulmón de células pequeñas [65]. Mientras que el tratamiento con Iri está muy extendido en el cáncer colorrectal [66], [67] y en el cáncer de pulmón de células no pequeñas [68]. Una ventaja adicional de estos derivados de CPT es que poseen la capacidad de traspasar la BHE [69]. Por esta razón, como se explicaba en la Sección 1.3.7 *Tratamiento del Glioblastoma Multiforme en la actualidad*, también se está

## 1. Introducción

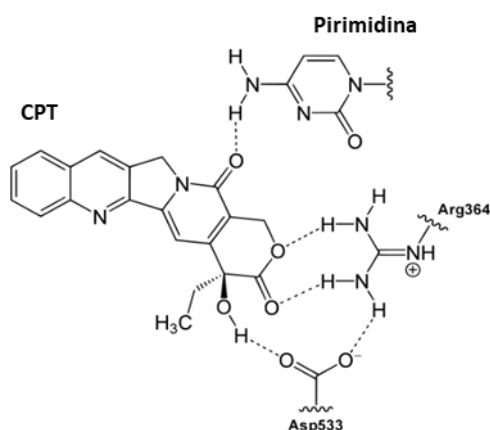
comenzando a implantar el tratamiento con Iri en los casos de Glioblastoma recurrente [70] y con MGMT no metilado, resistente a la actividad de TMZ [71]. Recientemente también se está comenzando a investigar su eficacia como agente antitumoral de primera línea para el tratamiento de GBM [49]. Estos agentes pueden llegar al GBM tras una administración sistémica intravenosa poco invasiva, evitando la implantación de obleas en la zona tumoral. El uso de derivados de CPT en la actualidad es muy amplio, no obstante, todavía no conocemos todo el potencial anticancerígeno que pueden tener estas terapias. Hoy en día hay en marcha numerosos ensayos clínicos que estudian el efecto de estos fármacos y nuevos análogos de CPT en otros tipos de tumores [63], [72], [73].

La actividad anticancerígena de la CPT radica en la inhibición de la Topoisomerasa I de DNA. Este enzima genera de forma transitoria una rotura en una sola cadena de DNA, su mecanismo de acción se muestra en la **Figura 10**. Esta rotura en el esqueleto fosfodiéster permite a las dos secciones de la hélice del DNA, situadas a cada lado de la muesca, girar libremente una respecto a la otra utilizando como punto de giro el enlace fosfodiéster de la cadena no cortada. De esta forma la hélice de DNA rotará en el sentido en el que se disipa la tensión generada durante el avance de la replicación, y finalmente el enlace fosfodiéster se forma de nuevo, regenerándose la hélice y la cadena de DNA.



**Figura 10:** Mecanismo de acción de la Topoisomerasa I de DNA y su papel en la Replicación de DNA. Imagen tomada: Banco de Imágenes Pixabay

Cuando la Topoisomerasa se encuentra unida al DNA, durante la replicación, la CPT se une a dicho complejo estabilizándolo e impidiendo que la Topoisomerasa I finalice la reacción de religación de DNA.



**Figura 11:** Interacción entre la CPT y el complejo Topoisomerasa-DNA. Imagen tomada de [63]

La estabilización de la Topoisomerasa I de DNA y, por tanto, su inhibición, ocurre como consecuencia de la interacción de la CPT con tres aminoácidos del centro activo de la Topoisomerasa I [63]. El grupo hidroxilo de la CPT reacciona con un aspartato situado en el centro activo de la Topoisomerasa (Asp533). En este mismo anillo, la lactona se une con dos enlaces de hidrógeno con los grupos amino de una arginina (Arg364). El anillo anterior a este interactúa con la pirimidina de la cadena de DNA y un residuo de citosina

pertenciente a la Topoisomerasa. Estabilizando, de esta forma, el complejo Topoisomerasa-DNA mediante la formación de enlaces no covalentes, tal y como se muestra en la **Figura 11**. Esto ocasiona la escisión de la hebra de DNA unida al enzima además de la separación de las dos hebras de forma indefinida. Esto conlleva daños en la estructura del DNA y provoca el inicio de la cascada de apoptosis. Por esta razón, los tumores con alta tasa de proliferación, como el GBM, presentan una mayor sensibilidad a la acción de la CPT y sus análogos [62].

### 1.8. Ruta de biosíntesis de porfirinas y hemo: 5ALA

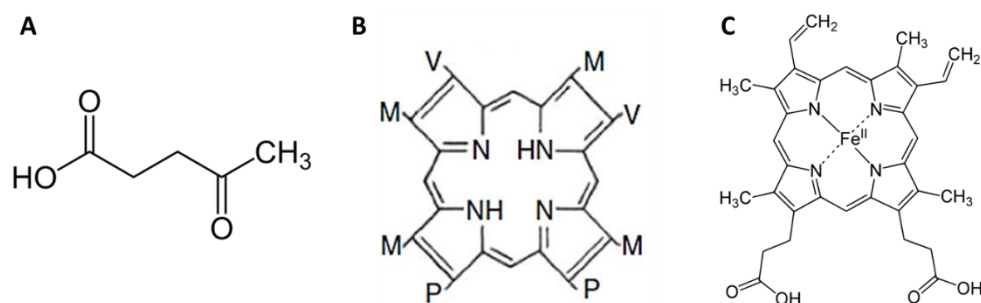
El descubrimiento de la ruta de biosíntesis del grupo hemo fue llevada a cabo por David Shemin y David Ritteberg en el año 1945. Ellos rastrearon el origen de todas las moléculas de esta ruta de biosíntesis utilizando isótopos radiactivos de carbono ( $^{14}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $^{15}\text{N}$ ). Mediante esta técnica pudieron demostrar que todos los átomos de C y N del grupo hemo derivaban del Succinil-coA, sintetizado en el ciclo del ácido cítrico, y de la glicina.

La síntesis de hemo ocurre principalmente en la médula ósea y en el hígado. El primer paso en la ruta de biosíntesis del hemo es la generación del ácido 5-aminolevulínico (5ALA), cuya estructura encontramos en la **Figura 12-A**, reacción es catalizada por el enzima ácido 5-aminolevulínico sintasa. Esta enzima condensa el Succinil-coA con la glicina generando el 5ALA. La cantidad de 5ALA disponible es uno de los principales factores limitantes de la síntesis de hemo ya que sin este sustrato es imposible sintetizar los sucesivos compuestos. En el siguiente paso de la ruta se forma el anillo pirrólico, que es la base de la molécula de porfirina. Esta molécula se forma a través de la condensación de dos moléculas de 5ALA que producen Porfobilinógeno (PBG). Cuatro moléculas de PBG forman un tetrapirrol lineal formado por cuatro anillos que al ciclarse sobre sí mismos, se genera el uroporfirinógeno III, precursor de la molécula



## 1. Introducción

Protoporfirina IX (PpIX) [74]. Como se ve en la **Figura 12-B**, esta molécula es un sistema de anillos heterocíclicos que presenta una disposición singular de los cuatro grupos metilo sustituyentes (M); dos propionato (P) y dos vinilo (V). PpIX es un compuesto fotoactivo que emite en luz roja ( $\lambda_{em}=635nm$ ) cuando es excitado usando luz azul ( $\lambda_{em}=375-400nm$ ) [75]. Como se explicó en la Sección 1.3.7 *Tratamiento del Glioblastoma Multiforme en la actualidad*, la fluorescencia de PpIX es empleada para marcar el GBM durante la cirugía y como tratamiento basado en fototerapia.



**Figura 12:** Estructura química de A) Ácido 5-aminolevulínico B) Protoporfirina IX C) Grupo Hemo. Imágenes de dominio público.

Por último, el grupo hemo, mostrado en la **Figura 12-C**, es generado cuando el enzima Ferroquelatasa añade el Fe en el anillo central de la molécula PpIX [76]. Aproximadamente un 85% del hemo sintetizado en esta ruta se destina a la síntesis de hemoglobina de los eritrocitos. Para degradar esta molécula, el átomo de hierro se reutiliza en nuevos grupos hemo y la parte de globina se recicla o se degrada a aminoácidos. Sin embargo, el anillo porfirínico es hidrofóbico y tiene que ser procesado para ser excretado. Se degrada a bilirrubina, la cual también tiene carácter hidrofóbico y se transporta al hígado. Donde se degrada a los pigmentos biliares; urobilinógeno y urobilina. Estos compuestos son solubles y pueden ser excretados con la bilis.

En este trabajo hemos escogido como estrategia para el tratamiento del GBM un profármaco compuesto, en parte, por 5ALA. La primera razón por la que se ha seleccionado esta molécula ha sido por su capacidad de traspasar la BHE [77]. La segunda razón es porque el consumo de 5ALA de las células de GBM es muy elevado en comparación con las células normales no tumorales [75]. Al tratarse del factor limitante en la ruta de biosíntesis del grupo hemo, su consumo oral permitirá la producción y la acumulación de PpIX en las células de los gliomas malignos. Una ventaja de la inducción de PpIX inducida por 5ALA exógeno es que el GBM muestra un consumo preferencial de 5ALA en comparación con los tejidos intracraneales normales [78]. Esta acumulación también viene favorecida por el silenciamiento del gen codificante para el enzima ferroquelatasa, encargado de transformar PpIX a hemo [77]. La diferencia de concentración en PpIX proporciona contraste entre el tejido normal y tumoral. El

carácter fotoactivo de PpIX ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=375\text{nm}/635\text{nm}$ ) se aplica en la actualidad a la cirugía y a la fototerapia. La acumulación de PpIX en el GBM permite la visualización de la masa tumoral al irradiar con luz azul durante la cirugía. La Resección Guiada por Fluorescencia (*Fluorescence Guided Resection* - FGR) ha permitido maximizar la resección del tumor, aumentando la salud y la esperanza de vida de los pacientes [40]. Las características fotoactivas de PpIX también la convierten útil para el uso de fototerapia dinámica (FTD). Esta técnica ocasiona la formación de singletes de oxígeno y especies reactivas de oxígeno [79]. Provoca la salida de Citocromo C de la mitocondria al citoplasma de las células cancerígenas, propiciando el inicio de la vía de la apoptosis por la activación de la Caspasa 9 [80]. Inicialmente, esta técnica se comenzó a utilizar en el tratamiento de cáncer de piel no melanoma y su uso se está extendiendo a otros tipos de cáncer. Como se ha indicado en la Sección 1.3.8 *Nuevos Tratamientos y enfoques*, actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase I y II con FTP por 5ALA para estudiar su eficacia en diferentes tipos de tumores cerebrales, entre los que se incluye el GBM [55].

### 1.9. Resumen y Propuesta de Trabajo

A lo largo de este trabajo nos hemos centrado en la mejora de la esperanza de vida de los pacientes afectados por el cáncer, un enorme problema social que cada vez ocasiona más muertes. Centrándonos no solo en el tratamiento de dicha enfermedad sino teniendo muy en cuenta la importancia que tiene el diagnóstico precoz para el pronóstico del paciente. Dentro del gran abanico de tipos de tumores, hemos elegido el Glioblastoma Multiforme por su gran agresividad e incidencia. Para la mejora del diagnóstico del GBM se ha trabajado en el desarrollo de un nuevo agente de contraste que permita la visualización del tumor en secuencia  $T_1$  y  $T_2$ . Esto permitirá que la imagen de resonancia magnética cuente con mayor detalle y resolución, contribuyendo al diagnóstico temprano y a maximizar la resección quirúrgica del tumor. Mientras que para la mejora en el tratamiento del GBM se ha diseñado y estudiado el efecto en la actividad antineoplásica del nuevo profármaco CPT-5ALA, derivado de la CPT, que sea capaz de evitar el desarrollo y crecimiento del tumor. Esperamos que el uso conjunto de estas dos nuevas herramientas permita realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad, para que, de esta manera, el tratamiento pueda comenzar en estadios tempranos del GBM. El tratamiento temprano del GBM puede ser determinante en el éxito de la terapia, ya que estos estadios presentan menos zonas infiltrantes y menor tendencia a la generación de resistencia a terapias que los estadios más avanzados.



# Objetivos



### 2. CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

El objetivo final que perseguimos en este trabajo es mejorar el proceso de diagnóstico y tratamiento clínico del Glioblastoma Multiforme, así como el desarrollo de dispositivos que permitan la mejora del proceso de investigación de ensayos preclínicos facilitando, de esta manera, el desarrollo de nuevos fármacos. Los objetivos principales descritos en esta memoria es la caracterización, en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, de un nuevo agente de contraste para imagen por resonancia magnética y de un nuevo profármaco anticancerígeno derivado de la camptotecina para sus posteriores aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento del Glioblastoma Multiforme, respectivamente.

Los objetivos específicos planteados en este trabajo son:

- 1) Simular el microentorno tumoral en un micro-dispositivo de cultivo celular en tres dimensiones.
- 2) Desarrollar un nuevo agente de contraste dual para imagen por resonancia magnética que mejore la visibilidad en secuencia T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.
- 3) Conocer el efecto del agente de contraste en modelos *in vivo* e *in vitro* y evaluar su posible toxicidad y efectos secundarios en el organismo tras una administración sistémica.
- 4) Caracterizar *in vitro* el efecto del nuevo profármaco derivado de la Camptotecina en líneas celulares de glioblastoma y células de sistema nervioso central. Describir y determinar la capacidad anticancerígena o citotóxica en modelos *in vitro*.
- 5) Analizar el efecto del profármaco en el organismo tras un tratamiento crónico y describir los posibles efectos secundarios que la molécula pudiera tener en el organismo. Especialmente en órganos implicados en la eliminación de fármacos, como el hígado y el riñón.
- 6) Comprobar la posible actividad antitumoral del profármaco CPT-5ALA en modelos animales con GBM intracraneal, tras un tratamiento crónico intravenoso.



# Material y métodos







## 3. CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Animales de experimentación

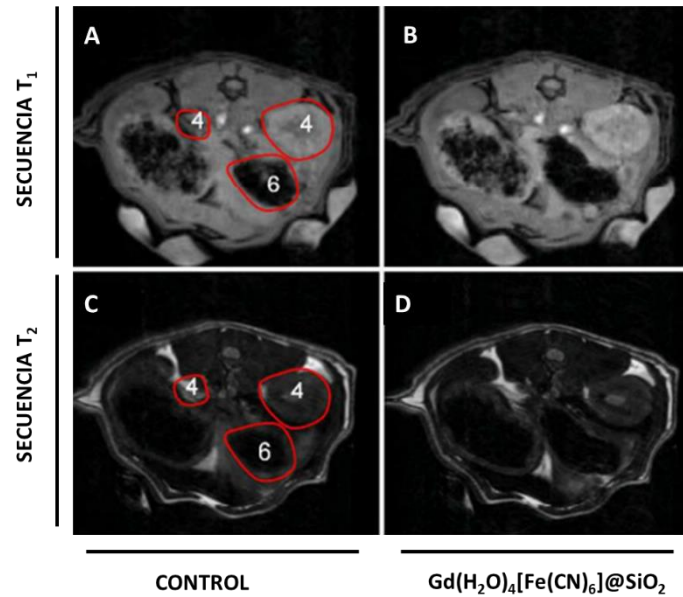
Para evaluar el efecto de los dos compuestos propuestos para este trabajo se utilizaron ratas Wistar hembras de 3 y 4 meses de edad, entre 200-300g de peso corporal. Por un lado, con estos animales se analizó la toxicidad en el organismo por parte de las nanopartículas magnéticas para MRI de  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$  (3.2.3. *Ensayo de Biocompatibilidad de AC*). Mientras que, por otro lado, también se utilizaron para generar un modelo animal de GBM y estudiar la actividad anticancerígena del profármaco CPT-5ALA y su reacción en el organismo. Tal y como se describe en el apartado 3.3.2 *Procedimiento in vivo*.

Se emplearon embriones de ratas Sprague Dawley en día de gestación E17-18 para aislar células de cultivo primario de corteza cerebral (3.3.1.1 *Cultivos celulares*).

Todos los experimentos con animales realizados en este trabajo fueron aprobados previamente por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Se realizaron acorde con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y con el R.D 53/2013 de la Regulación Española sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. Ambas cepas de ratas fueron proporcionadas por el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Los animales fueron mantenidos *ib libitum* en ciclos de luz y oscuridad 12:12h a temperatura ambiente.

### 3.2. Estudio de la toxicidad del agente de contraste $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$

En los apartados de *Introducción* y *Objetivos* se indica la necesidad de diseñar un nuevo agente de contraste para MRI visible tanto en la secuencia  $T_1$  como en la  $T_2$ . A fin de obtener una mayor cantidad de información a partir la MRI y poder realizar diagnósticos más precisos y detallados de la patología que permitan mejorar la resección tumoral en la cirugía. Concretamente, en el área de oncología esta nueva técnica podría favorecer el diagnóstico precoz de los tumores, especialmente del GBM, mejorando el pronóstico del paciente. Con el propósito de analizar su biocompatibilidad, en este trabajo se ha estudiado el efecto, *in vitro* e *in vivo*, de la nanopartícula magnética  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ , un agente de contraste, que como se muestra en la **Figura 13** mejora la señal de la secuencia  $T_1$  y  $T_2$  [20].



**Figura 13:** Imagen de sección coronal in vivo en secuencia T1 (Imágenes A y B) y T2 de rata (Imágenes C y D). A y C) Control sin administración  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2@PEG$ ; B y D) Imágenes tomadas tras 30 minutos de la administración de 5mg  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2@PEG$ . 4: Riñones, 6: Páncreas. Imagen tomada de [20].

### 3.2.1. Cultivos celulares y tratamiento con $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$

En este ensayo se emplearon cuatro líneas celulares distintas: HeLa (cáncer de cérvix humano), 3T3 (Fibroblastos de ratón), SH-SY5Y (Neuroblastoma humano) y 42-MG-BA (Glioblastoma Multiforme humano), provenientes de la casa comercial DSMZ. Las células HeLa fueron cultivadas en MEM (Earle's) (Gibco by Life Technologies Ref.42360-024), la línea 3T3 y 42-MG-BA en DMEM (Gibco by Life Technologies Ref.42430-025) y las células SH-SY5Y en DMEM:Ham (F12) Nut Mix (1:1) (Gibco by Life Technologies Ref.31765-027). Todos los medios celulares fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*- FBS, Biowest CAT# S181B-500) y Penicilina-Estreptomicina 1:100 (v/v) (Gibco by Life Technologies, Ref. 15140-122).

El primer día del protocolo, DIV0 (Días *in vitro*) se realizó la siembra de las distintas líneas celulares empleadas. En un primer paso las células fueron tripsinizadas para obtener la suspensión celular mediante el siguiente protocolo:

- Las células se lavaron 2 veces con PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*).
- Las placas se incubaron con Tripsina durante 5 minutos a 37°C. La Tripsina es una peptidasa que degrada las uniones proteicas entre las células y el soporte.
- Neutralizar la actividad de la Tripsina con medio neutralizante (DMEM suplementado 10% FBS).

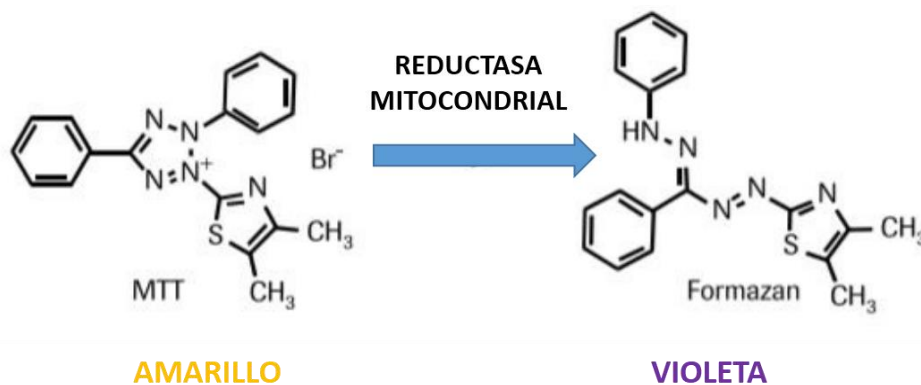
### 3. Material y Métodos

- Centrifugar la solución de células a 1200 r.p.m. durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en el medio celular correspondiente para cada línea.

Finalmente, se contabilizó la densidad celular con una cámara de Neubauer. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 200  $\mu$ l del medio de cultivo correspondiente de cada línea celular. Las densidades de siembra empleadas fueron las siguientes: 10000 células de HeLa/mL; 100000 células de SH-SY5Y/mL y 50000 células de las líneas 3T3 y 42-MG-BA/mL. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C con una inyección de 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas estas 24 horas, en DIV1, las células fueron tratadas con concentraciones variables del AC (0,25-100 $\mu$ g/mL). Los cultivos incubados en su correspondiente medio celular e incubados en 30% DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich Ref. D5879-M) se utilizaron como control de mortalidad negativo y positivo, respectivamente. Las placas se incubaron en presencia del AC durante 24 horas a 37°C con una inyección de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.2. Ensayo de Viabilidad celular por el método MTT

Transcurridas las 24 horas de incubación de las células con el tratamiento de AC, en DIV3, se midió la viabilidad celular mediante el método de MTT (Sigma Ref. M2128). Este ensayo permite cuantificar la viabilidad del cultivo celular a partir de la actividad enzimática de las células viables. Este método cuantifica la reducción, por acción del enzima mitocondrial Succinato Deshidrogenasa, del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) en 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (formazán), reacción que se muestra en la **Figura 14**.



**Figura 14:** Reacción de Reducción de MTT a Formazán. Imagen modificada de Sigma-Aldrich

Para llevar a cabo este ensayo, se añadió una solución stock de 20%MTT (5mg/mL MTT en PBS) en el medio celular, obteniendo una concentración final de 1mg MTT/mL. Las placas se incubaron en presencia de MTT durante 3 horas a 37°C. Pasado este tiempo de incubación, los

cristales de formazán procedentes de la reducción de MTT se disolvieron en 100µl DMSO (Sigma-Aldrich Ref. D5879-M). La absorbancia de la placa se midió a 595nm utilizando un lector de placas 1681130 iMark™ Microplate Reader. Los valores de absorbancia se normalizaron, en forma de porcentaje de viabilidad celular, respecto a los controles negativos sin tratar, utilizando la **Ecuación 1**. Se realizaron seis experimentos independientes (n=6), y cada condición se realizó por triplicado.

$$\text{Viabilidad Celular Relativa} = \frac{\text{Densidad óptica}_{595} \text{ MUESTRA TRATADA}}{\text{Densidad óptica}_{595} \text{ CONTROL}} * 100 \quad (1)$$

El IC<sub>50</sub> del profármaco y de CPT-5ALA para cada tipo celular se calculó mediante una regresión sigmoidea no lineal de dosis- respuesta utilizando Prim 6.0. software (GraphPad, San Diego, CA).

#### 3.2.3. Ensayo de Biocompatibilidad de AC

Para evitar el reconocimiento no específico del AC por parte del sistema inmune y, así, aumentar el tiempo de aclaramiento en el organismo, el AC fue modificado y recubierto con cadenas de polietilenglicol (PEG) [81]. Dando como resultado la molécula [Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub>@PEG. El compuesto fue administrado en ratas Wistar (Sección: 3.1 *Animales de Experimentación*) para determinar si causa, o no, algún tipo de lesión o daño tisular en el organismo. Este estudio se llevó a cabo inyectando 1mL de una suspensión de 5mg AC/mL, el equivalente a 0,05mmol Gd/kg peso corporal y 0,05mmol Fe/kg peso corporal, en la vena lateral de la cola del animal. Dos horas después de la administración del compuesto, los animales fueron sacrificados con 40mg/kg Pentobarbital Sódico (Dolethal®, Vetoquinol), administrado de forma intraperitoneal. Para realizar el estudio del efecto del AC en el organismo, se recogieron muestras de pulmón, hígado, bazo y corazón para su análisis histológico. Los órganos se fijaron en 4% Paraformaldehído (PFA) durante 48 horas y posteriormente se incluyeron en parafina utilizando el siguiente protocolo:

- |                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| - Agua destilada: 1 hora  | - Alcohol 100%: 45 minutos |
| - Agua destilada: 1 hora  | - Alcohol 100%: 45 minutos |
| - Alcohol 70%: 45 minutos | - Xileno: 45 minutos       |
| - Alcohol 70%: 45 minutos | - Xileno: 45 minutos       |
| - Alcohol 96%: 45 minutos | - Parafina: 4 horas        |
| - Alcohol 96%: 45 minutos | - Parafina: 6 horas        |

Posteriormente los órganos se cortaron en el micrótopo con un grosor de 5-7 $\mu$ m. Finalmente, las secciones se tiñeron con Hematoxilina/Eosina utilizando el protocolo:

- Xilol I: 5 minutos
- Xilol II: 5 minutos
- Alcohol 100%: 4 minutos
- Alcohol 96%: 4 minutos
- Alcohol 70%: 4 minutos
- Agua destilada: 5 minutos
- Hematoxilina: 1 minuto
- Agua destilada: 5 minutos
- Eosina: 1 minuto
- Agua destilada: 3 minutos
- Alcohol 70%: 4 minutos
- Alcohol 96%: 4 minutos
- Alcohol 100%: 4 minutos
- Xilol I: 5 minutos
- Xilol II: 5 minutos

Las imágenes de histología fueron tomadas utilizando un microscopio Olympus AX70.

#### 3.3. Estudio de la actividad anticancerígena y toxicidad del profármaco CPT-5ALA

En los apartados de *Introducción y Objetivos* se expone la urgencia de desarrollar una terapia para el tratamiento del GBM que logre frenar o controlar su crecimiento. En este estudio se ha analizado la actividad anticancerígena y la toxicidad del profármaco propuesto CPT-5ALA en modelos *in vitro* e *in vivo*.

##### 3.3.1. Procedimiento *in vitro*

###### 3.3.1.1. Cultivos celulares

En este estudio se ha trabajado con tres líneas de glioblastoma: la línea celular de glioblastoma de rata C6 y las líneas de glioblastoma humano U87 y U251. La línea C6 fue comprada a la American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) y las dos líneas de glioblastoma humano fueron donadas por el Profesor Luis Fernández, perteneciente al Group of Structural Mechanics and Materials Modelling (GEMM) de la Universidad de Zaragoza. Así mismo, también se han realizado los ensayos de toxicidad del profármaco en células de cultivo primario de corteza cerebral de rata y de astrocitos normales. Con el fin de caracterizar el efecto que podría tener el fármaco en las células sanas del cerebro.

En DIVO, las líneas celulares se tripsinizaron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.1 *Cultivos celulares y tratamiento con  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$*  y se sembraron en placas de 96 pocillos en un volumen final de medio de cultivo de 200 $\mu$ l. Las células C6 y de U87 se sembraron a una densidad celular de 25000 cell/mL, mientras que las células U251 a 50000

cell/mL. Todas las líneas celulares fueron mantenidas en DMEM (1X) suplementado con 10% FBS y Penicilina-Estreptomicina 1:100 (v/v).

Las células de tejido cortical de rata fueron aisladas de embriones de ratas Sprague Dawley de día de gestación E17-18 (Sección 3.1 *Animales de experimentación*). En primer lugar, el tejido se disoció mecánicamente y después fue incubado durante 15 minutos con DMEM y tripsina a 37°C para su disociación química [82]. La suspensión de células corticales resultante de este proceso fue utilizada para generar dos tipos de cultivos; cultivo de astrocitos aislados y un cultivo de células corticales compuesto principalmente por neuronas y astrocitos. Estos dos tipos de cultivos celulares permitirán determinar el efecto de CPT-5ALA en las células precursoras del GBM, es decir los astrocitos, y en otros tipos de células del SNC. Para obtener los dos tipos de cultivos celulares mencionados, cada tipo celular fue cultivado en medios de cultivo diferentes. Las células corticales fueron sembradas con una densidad celular de 65.000 cel/mL y mantenidas en Neurobasal Medium (GIBCO by Life Technologies Ref. 12348-017), suplementado con 2%FBS, 2% del factor de crecimiento B27 factor (GIBCO by Life Technologies Ref. 17504-044), 0,4% Glutamax™ (GIBCO-Invitrogen Ref. 35050-038) y 0,4% de Penicilina-Estreptomicina 1:100 (v/v). Los astrocitos se sembraron en una densidad celular de 60.000 cel/mL y fueron mantenidos en un medio de cultivo similar al de las células corticales, pero suplementado con 10% de FBS y sin factor de crecimiento B27. Las células fueron sembradas en placas pretratadas con Poli-D-Lisina (PDL-Sigma-Aldrich Ref. P6407) y Laminina (Sigma-Aldrich, Ref. L2020).

Las placas con las líneas celulares y el cultivo primario se incubaron 24 horas a 37°C con una inyección de 5% de CO<sub>2</sub> hasta su posterior tratamiento con CPT-5ALA.

#### 3.3.1.2. *Ensayo de Viabilidad celular por el Método de MTT*

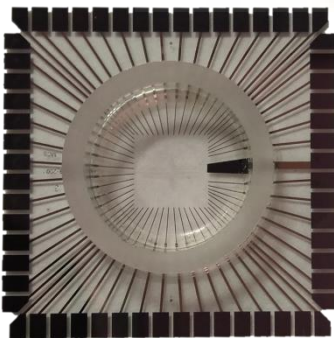
El tratamiento de los cultivos celulares con el profármaco CPT-5ALA y CPT se inició en DIV1 en el caso de las líneas celulares y en DIV14 en el caso de ambos tipos de cultivo primario. Estos ensayos de viabilidad también fueron realizados con CPT con el objetivo de comparar la actividad de ambos anticancerígenos. La concentración de los fármacos se expresa en equivalentes de CPT (CPTeq) debido a que la molécula CPT-5ALA presenta un mayor peso molecular que la CPT. Ambos fármacos fueron diluidos en una disolución Stock 1,5mM con DMSO (Sigma-Aldrich Ref. D2438). Los cultivos fueron tratados utilizando concentraciones crecientes de CPT-5ALA y CPT (0,002-4,8 µg CPTeq/mL). Al emplear concentraciones crecientes de profármaco se podrá determinar cómo afecta al crecimiento y a la viabilidad celular. Las células incubadas en su correspondiente medio de cultivo e incubadas en 30% DMSO se

utilizaron como control de mortalidad negativo y positivo, respectivamente. Se realizaron al menos 6 experimentos independientes ( $n > 6$ ) y cada una de las condiciones experimentales de realizó por triplicado.

Para analizar y comprobar si la citotoxicidad del compuesto CPT-5ALA radica en su efecto sobre el ciclo celular, las células se incubaron en presencia de ambos fármacos en atmósfera húmeda durante 24 y 72 horas  $37^{\circ}\text{C}$  con una inyección de 5% de  $\text{CO}_2$ . De manera que, al elevar el tiempo de tratamiento, se aumente el número de células en Fase S sensibles a la CPT. Pasado el tiempo de tratamiento con CPT y el profármaco CPT-5ALA, se realizó el Ensayo de viabilidad celular conforme al apartado 3.2.2 *Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT*.

#### 3.3.1.3. Ensayo de Funcionalidad Neuronal

La existencia de actividad electrofisiológica espontánea en el cultivo cortical implica que las neuronas se encuentran viables y funcionales. Significa que las membranas celulares de las neuronas están intactas y que no se ha dañado la maquinaria *upstream* encargada de la formación del *spike*. Por esta razón, también puede ser utilizado como un indicativo de que el cultivo no ha sufrido daño crónico o agudo inducido por el fármaco [83]. En este sentido, el ensayo multielectrodo (MEA- *multi-electrode array*) es muy utilizado en farmacología, para monitorizar el efecto que tienen los fármacos sobre las neuronas y la red neuronal. La principal ventaja de este método es que es completamente no invasivo y no afecta a las células del cultivo.



**Figura 15:** Dispositivo Multi-Electrode Array (60MEA 200/30iR-Ti, casa comercial Multichannel System). Imagen propia

Como se muestra en la **Figura 15**, sobre la base del dispositivo MEA están dispuestos los electrodos sobre los cuales se siembran las células de cultivo cortical primario. Las neuronas entran en contacto con los electrodos de la red que recogerán el cambio de voltaje generado durante el potencial de acción. Este dispositivo puede analizar los potenciales de acción extracelulares de varias neuronas de forma simultánea [84]. De esta manera podremos evaluar el efecto del profármaco CPT-5ALA sobre la actividad neuronal.

El ensayo de MTT en las células de cultivo primario de corteza cerebral sólo nos aporta información acerca de la viabilidad del cultivo cortical, conformado por muchos tipos de células. Sin embargo, no nos da información sobre la funcionalidad de la red neuronal tras el tratamiento con CPT-5ALA. El registro de la actividad electrofisiológica espontánea mediante MEA permite complementar la información obtenida en el experimento de viabilidad por MTT para

determinar el estado de las neuronas. De esta manera obtendremos una mejor aproximación sobre el efecto que el profármaco CPT-5ALA puede tener en la funcionalidad neuronal *in vivo*. El GBM es un tumor derivado de células del SNC, por ello es necesario conocer si el fármaco ocasiona algún tipo de daño neuronal. De ser así se dificultaría su aplicación clínica, ya que podría generar graves complicaciones al paciente.

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento con profármaco de CPT-5ALA sobre la funcionalidad neuronal se registró la actividad electrofisiológica del cultivo primario de corteza cerebral. Las células corticales de embriones de rata fueron aisladas según la sección 3.3.1.1 *Cultivos celulares* y sembradas en sistemas MEA 60MEA 200/30iR-Ti de Multichannel Systems (MCS). Se sembraron 300.000 células corticales por sistema MEA, en un volumen final de medio celular de 1 mL. Las células fueron mantenidas en Neurobasal Medium suplementado con 2%FBS, 2% del factor de crecimiento B27 factor, 0,4% Glutamax™ y 0,4% de Penicilina-Estreptomicina 1:100 (v/v). El cultivo fue incubado a 37°C bajo atmósfera húmeda y una inyección de 5%CO<sub>2</sub>. El tratamiento con CPT-5ALA (3,2 µg CPTeq /mL) comenzó en DIV14. Desde ese momento, el cultivo fue tratado dos veces a la semana durante dos semanas, simulando el tratamiento *in vivo*. Los días de tratamiento del cultivo fueron: DIV 14, 17, 19, 22.

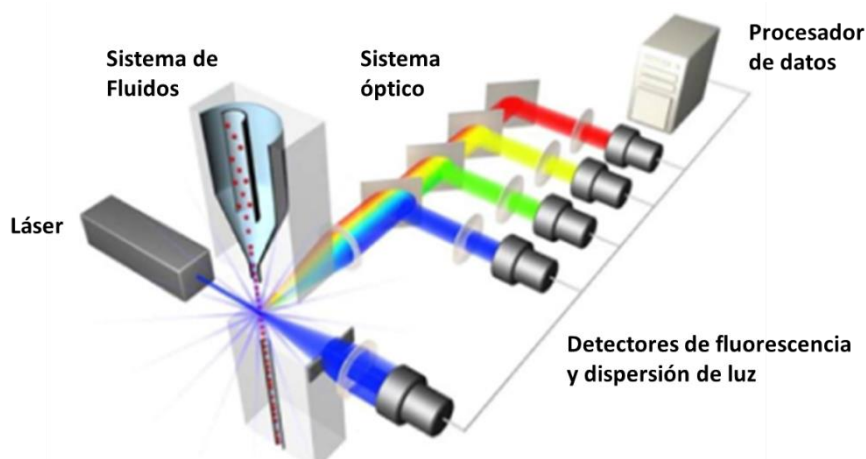
A lo largo de este tiempo, se realizaron registros de la actividad electrofisiológica extracelular de 5 minutos de duración. La señal recogida fue amplificada y digitalizada por un equipo MPA3121 de Multichannel Systems (MCS). La señal *input* fue adquirida y grabada por el MC-Rack Software (MC Rack Version 4.6.2- Multi Channel System MCS GmbH). Durante toda la sesión de registro las células fueron mantenidas a 37°C. Los datos se digitalizaron y, para eliminar las señales de ruido de alta y baja frecuencia, se filtraron a 100-3000Hz usando un filtro Butterworth tipo IIR del MC-Rack software. Finalmente, se realizó el Spike Sorting con NeSo Software para eliminar manualmente los eventos de ruido que han sido clasificados por el MC-Rack Software como potenciales de acción. Se realizaron 5 experimentos independientes de este ensayo (n=5).



#### 3.3.1.4. Estudios de citometría de flujo

El citómetro de flujo es una técnica analítica que aporta información sobre poblaciones celulares realizando un estudio individualizado de un gran número de células. Generalmente, el tamaño muestral se encuentra entre los 5.000 y 10.000 eventos, por lo que la información obtenida es representativa del conjunto poblacional. Como muestra la **Figura 16**, las células en suspensión van pasando de una en una, formando una corriente continua, a través de un capilar. Sobre esta corriente de células se incide un haz de luz láser, que permite obtener información sobre la dispersión, la reflexión de la luz y la fluorescencia. Toda esta información es recogida por varios detectores para su digitalización. El análisis por citometría de flujo permite medir simultáneamente tres tipos parámetros sobre las células:

- Detección de células: Cuando una célula atraviesa el haz de luz láser se genera una dispersión de la luz que es detectada por un fotodetector que se encuentra justo enfrente de la lámpara. El tiempo que dura la interrupción del haz de luz será proporcional al volumen de la célula. Este parámetro es conocido como *Forward Scatter* (FSC).
- Complejidad: Cuando la célula atraviesa el haz de luz láser también dispersa la luz. La dispersión de la luz es recogida por un detector que se encuentra en un ángulo de 90° respecto el haz de luz emitido. Este parámetro aporta información sobre la rugosidad de la superficie celular y la densidad de orgánulos en su interior. Se conoce como *Side Scatter* (SSC).
- Fluorescencia de marcaje: La luz dispersada por la célula es recogida por detectores de diferentes rangos de longitud de onda. Permite determinar la intensidad y longitud de onda de la fluorescencia procedente de la célula.



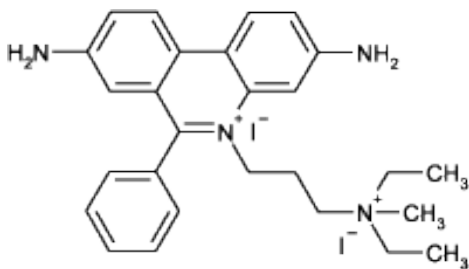
**Figura 16:** Esquema general de citómetro de flujo. (Imagen modificada de Invitrogen, Flow Cytometry)

En este trabajo se ha utilizado el citómetro de flujo para analizar el nivel de apoptosis y necrosis en el cultivo de células de glioblastoma en respuesta al tratamiento con CPT-5ALA y el efecto del fármaco sobre el ciclo celular. Para realizar estas dos técnicas, en primer lugar, se acotó la población de las células de glioblastoma de la línea C6 en función de los parámetros de FSC y SSC. A partir de esta población se obtuvieron y analizaron los resultados de ambos procedimientos, es decir el ensayo de apoptosis y de ciclo celular en respuesta al tratamiento con CPT-5ALA.

#### 3.3.1.4.1. Ensayo de apoptosis por marcaje con Annexina V/Ioduro de Propidio

La interrupción de la síntesis de DNA por parte del profármaco CPT-5ALA desestabilizaría la cadena y provocaría la apoptosis de las células en Fase S. Para confirmar este fenómeno, en este ensayo se ha evaluado la apoptosis inducida por el profármaco CPT-5ALA en las células C6 de glioblastoma de rata. Para ello hemos hecho un marcaje de necrosis y apoptosis mediante Ioduro de Propidio (IP) y Annexina V.

El marcaje de las células apoptóticas con Annexina V se basa en la unión de esta molécula con la fosfatidilserina. La detección de este fosfolípido es una de las formas más fiables para revelar la apoptosis. En las células viables, la fosfatidilserina se mantiene en la capa interna de la membrana celular. Cuando ocurre la apoptosis, la fosfatidilserina migra hacia el exterior de la membrana celular, quedando accesible a la Annexina V y permitiendo la unión entre ambas moléculas. Para visualizar el marcaje, la Annexina V empleada en este ensayo está marcada con FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*) un fluoróforo que posee un máximo de absorción a 494nm y de emisión a 520nm.



**Figura 17:** Estructura química de Ioduro de Propidio. Imagen tomada de Sigma-Aldrich

El marcaje de las células necróticas y apoptóticas tardías con IP se basa en la rotura de la membrana plasmática que ocurre a lo largo de estos procesos. El IP es un agente intercalante de DNA que cuando se une al DNA se vuelve fluorescente y presenta absorción en 535nm y una emisión a 617nm, su estructura molecular se puede observar en la

**Figura 17.** De modo que cuando la membrana plasmática pierde su integridad, el IP puede penetrar en la célula, donde intercala con el DNA adquiriendo fluorescencia. De esta manera podremos visualizar las células necróticas y en apoptosis tardía. El doble marcaje de Annexina V con IP permite discriminar la población celular en células viables, células apoptóticas tempranas, células apoptóticas tardías y necróticas.

### 3. Material y Métodos

Para realizar este ensayo, las células C6 de la línea de glioblastoma de rata se tripsinizaron conforme el apartado 3.3.1.1 *Cultivos celulares* y se sembraron en placas cultivo de 12 pocillos. En DIV1 las células fueron tratadas con CPT-5ALA (0,002; 0,4 y 1,6  $\mu\text{g CPTeq/mL}$ ) e incubadas con el tratamiento 24 horas en atmósfera húmeda a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo de incubación con el fármaco, las células fueron lavadas brevemente con PBS y tripsinizadas para obtener las células en suspensión. Finalmente, y atendiendo a las recomendaciones del fabricante (Apoptosis Detection Kit, Cat# B32115 Biotool), las células se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente con una solución de marcaje compuesta por 5 $\mu\text{l}$  Annexina V-FICT, 5 $\mu\text{l}$  PI y 100 $\mu\text{l}$  Binding Buffer. La reacción de marcaje fue neutralizada añadiendo 400 $\mu\text{l}$  Binding Buffer. Las muestras fueron mantenidas en hielo y analizadas inmediatamente en un equipo FACSCanto™ System (BD- Biosciences). Para cada muestra se analizaron 10000 eventos con una velocidad de análisis de flujo medio. Para delimitar la población de las células de C6 en función de FSC y SSC en el citómetro de flujo y establecer la autofluorescencia del cultivo, se utilizaron células sin marcar. Las células incubadas en medio celular, sin tratamiento, fueron usadas como control negativo de apoptosis y necrosis, y para delimitar la población de células viables (Annexin V<sup>-</sup>/ PI<sup>-</sup>). Las células con marcaje de Annexina V y sin marcaje con IP (Annexin V<sup>+</sup>/ PI<sup>-</sup>) se clasificaron como células en apoptosis temprana. Las células marcadas con IP, y negativas en marcaje con Annexina V (Annexin V<sup>-</sup>/ PI<sup>+</sup>), se consideraron como células necróticas. Finalmente, las células que presenten ambos tipos de marcaje se tomaron como células en apoptosis tardía (Annexin V<sup>+</sup>/ PI<sup>+</sup>). Se realizaron cuatro experimentos independientes para cada muestra (n=4). Los datos obtenidos en este ensayo fueron analizados con BD FACSDIVA™ Software.

#### 3.3.1.4.2. *Ensayo de ciclo celular por marcaje con Ioduro de Propidio*

Este ensayo es muy utilizado para analizar la capacidad antiproliferativa de los nuevos anticancerígenos, ya que el ciclo celular es una de las principales dianas utilizadas en el tratamiento del cáncer. Permite comprobar si el fármaco posee algún efecto sobre el transcurso del ciclo celular. El profármaco de CPT-5ALA que se propone en este trabajo interfiere con la Topoisomerasa I de DNA, impidiendo la síntesis de DNA durante la replicación. Lo que debería interrumpir el avance del ciclo celular, ocasionado un bloqueo de este. Para comprobar si existe algún efecto del profármaco sobre el ciclo celular, hemos realizado un ensayo para determinar si existen variaciones en la distribución de la población de células C6 de glioblastoma en las diferentes fases del ciclo celular en respuesta al tratamiento con CPT-5ALA.

Este ensayo se basa en la cuantificación de la fluorescencia emitida por las células teñidas con el agente intercalante IP. Dado que la unión entre el DNA y el IP sigue una relación

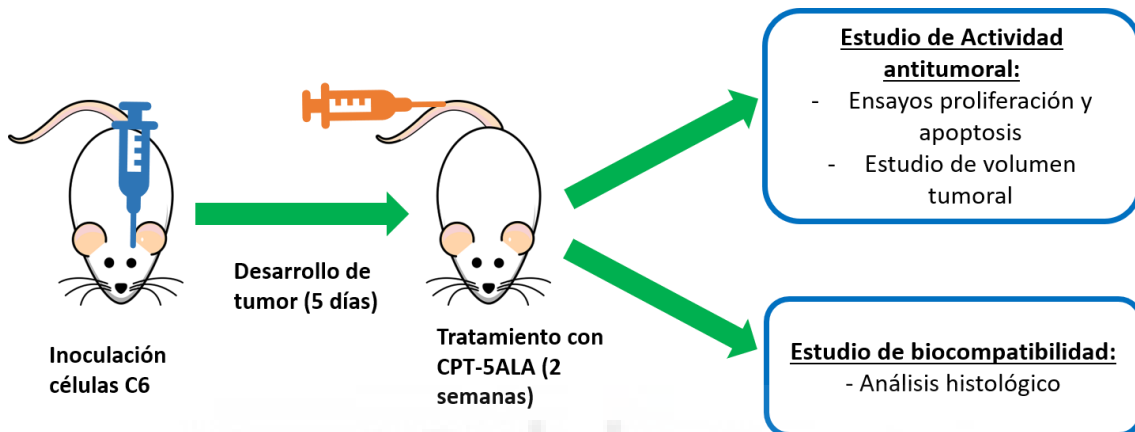
### 3. Material y Métodos

estequiométrica, la cantidad de fluorescencia emitida por el IP de una célula será proporcional a la cantidad de DNA en la célula. Esto permitirá discriminar las poblaciones celulares en función de la cantidad de DNA de su núcleo, en función de si son diploides (2n) o tetraploides (4n). De esta manera clasificaremos las células en fase G0/G1 si son diploides (2n); en fase de mitosis (Fase M) si son tetraploides (4n) o en fase de síntesis de DNA (Fase S) si poseen una cantidad de DNA intermedia.

Para determinar si CPT-5ALA inhibe la replicación de DNA y arresta el ciclo celular de las células de glioblastoma, se determinó el porcentaje de células en cada fase de ciclo celular mediante citometría de flujo. Para ello, las células de C6 se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos, siguiendo el protocolo detallado en 3.3.1.1 *Cultivos celulares*. En DIV1 las células fueron tratadas con CPT-5ALA (0,002; 0,4 y 1,6  $\mu\text{g}$  CPTeq/mL) e incubadas con el tratamiento durante 6 y 24 horas en atmósfera húmeda a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Después del tratamiento, las células fueron fijadas con 2% PFA e incubadas 30 minutos a 37°C con 2,5 mg/mL RNasa (Sigma-Aldrich Ref. R6513) y 2,5 mg/mL IP (Sigma-Aldrich Ref. P4170). Las células fijadas y teñidas con IP se mantuvieron en hielo hasta su lectura con el equipo FACSCanto™ para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Para cada muestra se analizaron 10000 eventos con una velocidad de análisis de flujo lento. Las células sin tratar con CPT-5ALA teñidas con IP se utilizaron como control para definir la distribución normal de la línea C6 en las distintas fases del ciclo celular. Se realizaron cuatro experimentos independientes (n=4) para cada muestra. Los datos obtenidos en este ensayo fueron analizados con BD FACSDIVA™ Software.

#### 3.3.2. Procedimiento *in vivo*

Una vez determinado el efecto que posee el fármaco a nivel de la proliferación, el ciclo celular y la apoptosis en modelos *in vitro* con células de glioblastoma multiforme y en células del SNC, se analizaron sus efectos *in vivo*. En la **Figura 18** se muestra el esquema de trabajo realizado en esta parte experimental enfocada a la caracterización *in vivo* de CPT-5ALA. En ella se analizó la toxicidad derivada de la administración sistémica del compuesto CPT-5ALA y su actividad anticancerígena en modelos de GBM animales.



**Figura 18:** Procedimiento llevado a cabo *in vivo* para caracterización del profármaco CPT-5ALA. Las células de GBM C6 se inocularon intracranealmente. El tumor se desarrolló en el animal durante 5 días y pasado ese tiempo los animales fueron tratados con CPT-5ALA inyectado en la vena lateral de la cola. Finalmente se analizó la actividad antitumoral y la biocompatibilidad del fármaco. Imagen propia.

##### 3.3.2.1. Inoculación y generación del GBM en modelo animal

Las ratas Wistar (*Sección: 3.1 Animales de Experimentación*) fueron pretratadas con 1mg/kg de Dexametasona (Fortecortin<sup>®</sup>, MERCK) 24 y 1 hora previa a la cirugía. Antes de la intervención, se indujo el estado de anestesia en el animal con una dosis única de cóctel de 70mg/ml Ketamina (Ketamidol<sup>®</sup>, Richter Pharma) / 0,5mL/kg Xilacina (Xilagesic 2%, Calier) administrados intraperitonealmente. Durante la cirugía, se mantuvo la anestesia con gas 3% Isoflurano (IsoFlo<sup>®</sup>, Esteve, España) mezclado con O<sub>2</sub>, y la temperatura corporal se controló mediante una manta eléctrica. La cabeza del animal fue fijada en un marco estereotáxico. Se realizó una pequeña craneotomía de 1mm aproximado de diámetro en las coordenadas estereotáxicas: 1mm anterior y 3mm lateral izquierdo respecto a la línea de Bregma [85].

Con el objetivo de generar el modelo de glioblastoma animal, las células de la línea C6, previamente tripsinizadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1. *Cultivos celulares y tratamiento con Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub>*, se inocularon en el núcleo estriado a través de la craneotomía. Con ayuda de una jeringa Hamilton de calibre 33 se inyectaron 10<sup>5</sup> células

C6, con pases inferiores a 15, resuspendidas en 1,5 µl de PBS a una profundidad de 4mm. La solución con células tumorales se inyectó a un flujo de 0,1µl/min. Para evitar aplicar una presión negativa que implique la salida de las células tumorales en la zona de interés, una vez inyectado todo el volumen, se esperó 10 minutos para extraer la jeringa. La zona elegida para la implantación del tumor corresponde con un núcleo cerebral implicado en el control motor. Como se explicó en el apartado de *Introducción*, los síntomas del GBM varían en función de la zona afectada. Induciendo el tumor en un núcleo motor podremos monitorizar los síntomas y el bienestar del animal durante todo el experimento vigilando la aparición de alteraciones motoras. Durante los tres días siguientes a la cirugía, para mejorar el bienestar animal, se inyectó de forma subcutánea analgésico (0,05mg/kg buprenorfina, Buprex®), antiinflamatorio (0,5mg/kg meloxicam, Loxicom®) y antibiótico (5mg/kg Enrofloxacin, Alsir®).

#### 3.3.2.2. *Monitorización de los animales y tratamiento con CPT-5ALA*

El tratamiento con el profármaco CPT-5ALA comenzó a los 5 días de la inoculación de las células tumorales. Basándonos en experimentos previos [72], pasado el tiempo de establecimiento del tumor, los animales fueron tratados dos veces por semana durante dos semanas con 0,8mg CPTeq-5ALA/kg de peso corporal del animal (n=5). En el grupo control de animales sin tratamiento se inyectó DMSO: PBS (1:3 v/v) (n=3) en lugar de 0,8mg CPTeq-5ALA/kg. Ambas sustancias se inyectaron a través de la vena lateral de la cola empleando un catéter de calibre 24. Durante el tiempo que duró el experimento, se monitorizó diariamente el peso de los animales y su bienestar, que se evaluó mediante el Protocolo de Morton y Griffiths [86], mostrado en el **Anexo II**, y las expresiones faciales de los animales [87]. Para evitar el sufrimiento extremo de los animales, se estableció que, si la pérdida de peso superaba el 20% del peso inicial respecto al inicio del experimento o que, si la puntuación del test es superior o igual a 15 puntos, el animal debería ser sacrificado. Este test también establece que se deberá considerar la eutanasia en caso de que la puntuación sea mayor a 10 puntos. Para finalizar el experimento, los animales fueron sacrificados con una inyección intraperitoneal de 40mg/kg Pentobarbital Sódico (Dolethal®, Vetoquinol) tres días después de la última dosis de tratamiento con el profármaco CPT-5ALA. Posteriormente los animales fueron perfundidos para fijar los órganos de interés con 4%PFA.

#### 3.3.2.3. *Procesamiento histológico*

Para evaluar la biocompatibilidad del profármaco de CPT-5ALA, tras la perfusión del animal, se recogieron muestras de bazo, hígado, riñón, corazón y pulmón para su posterior análisis histológico. Los órganos recogidos se procesaron según el procedimiento descrito en 3.2.3 *Ensayo de Biocompatibilidad de AC*, incluyendo los órganos en bloques de parafina para, seguidamente, realizar cortes de 7µm de grosor con el micrótopo y teñir con Hematoxilina/Eosina. Finalmente se evaluó la morfología de los órganos para determinar si la administración sistémica del CPT-5ALA ha ocasionado algún tipo de daño tisular o hemorragia mediante un microscopio Olympus AX70.

#### 3.3.2.4. *Estudio de la actividad anticancerígena de CPT-5ALA*

Para evaluar la actividad antitumoral del profármaco de CPT-5ALA, los cerebros de los animales se fijaron con 4%PFA durante 48 horas y posteriormente se realizaron cortes de 20µm de grosor en el criostato. La actividad antitumoral se ha evaluado a través de la cuantificación y comparación del tamaño y la proliferación del tumor entre ambos grupos experimentales: Animales tratados con 0,8mg CPTeq-5ALA/kg de peso corporal del animal y animales inyectados con DMSO: PBS (1:3 v/v).

Para la cuantificación de la proliferación celular se realizó una inmunohistoquímica en los cortes de cerebro. Los cortes se incubaron durante 1 hora con 10% Albumina de Suero Bovino (*bovine serum albumin*, BSA - Sigma Ref. A4503) para bloquear el marcaje no específico del anticuerpo con otras proteínas no deseadas. Las muestras se permeabilizaron con 0.5% Triton - X-100, que creará poros en la membrana de las células para facilitar la entrada de los anticuerpos. Para el marcaje de proteínas se utilizaron anticuerpos primarios Anti-Ki67 (Ki67-Policlonal Antibody Rabbit IgG, Invitrogen-Thermo Fisher, PA5-16785) y Anti-GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein* Antibody Mouse IgG, Clone GA5, Millipore, CAT#MAB360) para detectar dichas dianas. GFAP es una proteína que conforma el citoesqueleto de los astrocitos, característica de procesos que implican cicatriz glial y encapsulación [88]. La proteína Ki67 es un marcador de células en mitosis, por esta razón su uso está ampliamente extendido para estudiar el efecto de los anticancerígenos sobre la proliferación celular. Los anticuerpos se diluyeron en 3%BSA y se incubaron *over night* en cámara húmeda a 4°C.

Cuando finalizó el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se eliminó el anticuerpo sobrante con sucesivos lavados con PBS. Finalmente, los cortes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios diluidos a una proporción 1:100

### 3. Material y Métodos

en 3%BSA. Las proteínas Ki67 y GFAP fueron detectadas mediante los anticuerpos secundarios Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugated donkey anti-rabbit IgG (Life Technologies, Thermo Fisher, Ref: A-21206) y Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen, Thermo Fisher, Ref: A-31570), respectivamente. Los núcleos celulares fueron marcados con HOECHST 33342 (1:300) ( $\lambda_{excitación}/\lambda_{emisión}=365nm/450nm$ ). Todos los Anticuerpos utilizados en este ensayo se resumen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la caracterización de la actividad antitumoral del profármaco CPT-5ALA**

| Anticuerpo   | Casa Comercial                   | Diana      | Inmunohistoquímica |
|--|----------------------------------|------------|--------------------|
| Ki67- Policlonal Antibody Rabbit IgG                           | Invitrogen-Thermo Fisher         | Ki-67      | 1:100              |
| Anti-GFAP Mouse IgG, Clone GA5                                 | Millipore                        | GFAP       | 1:200              |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 conjugated donkey anti-rabbit IgG | Life Technologies, Thermo Fisher | Rabbit IgG | 1:100              |
| Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 conjugated donkey anti-mouse IgG  | Invitrogen, Thermo Fisher        | Mouse IgG  | 1:100              |

Para analizar los datos obtenidos de la tinción inmunohistoquímica y calcular el grado de proliferación celular en el tumor, se tomaron siete imágenes aleatorias de la muestra con Carl Zeiss Apotome2.

Finalmente, el volumen del tumor fue calculado utilizando la **Ecuación 2** a partir de las medidas de dos distancias radicales perpendiculares [89] y normalizando el tamaño respecto el tamaño del tumor del grupo control sin tratamiento. La representación 3D fue realizada con el programa MATLAB.

$$V_{tumor} = \frac{4\pi}{3} r_x^2 r_z \quad (2)$$

Los datos obtenidos en la cuantificación de la proliferación celular y el tamaño del GBM en los animales tratados y sin tratar con CPT-5ALA nos permitirán determinar si el fármaco presenta o no actividad antitumoral para este tumor, complementando los ensayos en los modelos *in vitro*.



#### 3.3.2.5. *Ensayo de apoptosis in vivo por método TUNEL.*

El ensayo TUNEL permite detectar los extremos 3'-OH de los fragmentos de DNA producidos durante la apoptosis. Marcando el término libre con un nucleótido (dUTP) modificado marcado con fluoresceína en una reacción enzimática catalizada por el enzima Terminal deoxinucleotidil transferasa.

El TUNEL se llevó a cabo en los cortes cerebro de 20µm de grosor para comparar la apoptosis presente en el tejido cortical normal y en el tumor de los animales con y sin el tratamiento con 0,8mg CPTeq-5ALA/kg. El tejido del corte cerebral fue permeabilizado durante 2 minutos con una Solución de Permeabilización compuesta por 0,1% Triton X-100 diluido en 0,1% Citrato Sódico. Seguidamente, las muestras de cerebro fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C con la mezcla de TUNEL (Ref. 11684795910, Roche Molecular Biochemicals, Switzerland). La mezcla de TUNEL contiene 50µl de Solución de Enzima y 450µl de Solución de Marcado, en la cual están incluidos los nucleótidos modificados marcados con fluoresceína.

Se tomaron siete imágenes aleatorias de la zona con Carl Zeiss Apotome2 para determinar el grado de apoptosis en el tumor y poder determinar si CPT-5ALA aumenta la apoptosis en las células de GBM y para evaluar si ocasiona apoptosis en el tejido cortical sano.

#### 3.4. *Análisis Estadístico*

Los resultados obtenidos de estos estudios se expresan como el valor medio junto con su error estándar de la media (SEM). Para determinar si los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad *in vitro* con MTT son significativos se ha realizado un análisis del Test-t y un test Rank-Sum Wilcoxon. El análisis estadístico de los ensayos *in vivo* de proliferación celular, apoptosis y análisis de la actividad anticancerígena del profármaco de CPT-5ALA se han llevado a cabo con el Test-t. Finalmente, la significatividad estadística de los ensayos de citómetro de flujo de ciclo celular y de apoptosis se ha determinado mediante el test Chi-cuadrado. El análisis del Test-t y un test Rank-Sum Wilcoxon se realizó en Matlab (MathWorks), mientras que el test Chi-cuadrado se llevó a cabo con el programa Prim 6.0. software (GraphPad, San Diego, CA).





# Resultados



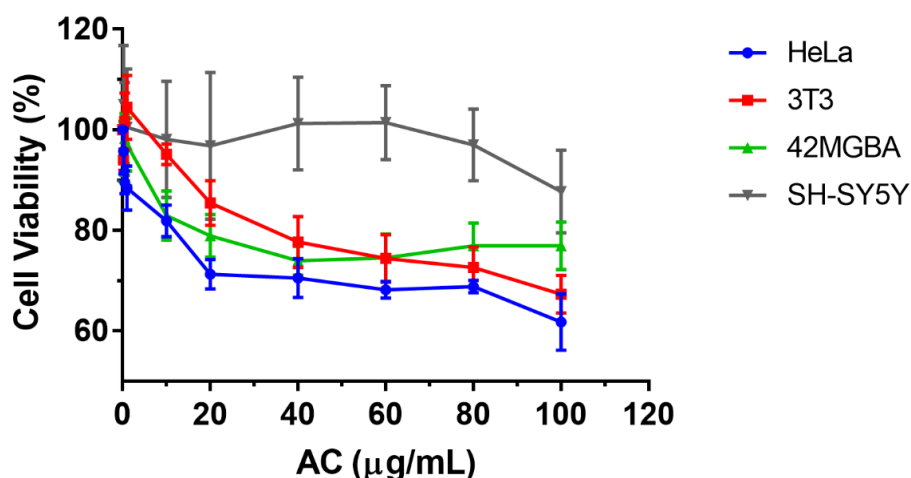
## 4. CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### 4.1. Estudio de la toxicidad del agente de contraste $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$

La primera parte de este proyecto trata la propuesta de mejora de las técnicas utilizadas actualmente en el diagnóstico del cáncer, concretamente del GBM. Para esta finalidad, en este trabajo se ha propuesto un nuevo AC dual con visibilidad en las secuencias de imagen T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> para el diagnóstico del GBM mediante MRI. Durante la primera parte de esta línea de investigación, previo a su administración sistémica en animales de investigación, se estudió el efecto que podría tener este compuesto sobre la viabilidad celular, mediante un ensayo de viabilidad por MTT. Una vez determinado el grado de toxicidad *in vitro* se procedió a la caracterización y la evaluación de la biocompatibilidad *in vivo* del AC mediante el análisis histológico de los órganos de los animales tras la administración sistémica del compuesto.

#### 4.1.1. Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT

El objetivo de este ensayo fue analizar la muerte celular ocasionada por el AC, el compuesto  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ , en las líneas celulares de HeLa, Fibroblastos 3T3, Glioblastoma 42MGBA y Neuroblastoma SH-SY5Y. La lectura de absorbancia de los cristales de formazan a 595nm obtenidos en el ensayo de viabilidad de MTT llevado a cabo tras 24 horas de exposición al AC para MRI no muestra una disminución de la viabilidad celular por debajo 60% respecto el grupo control sin tratamiento en ninguna de las condiciones del ensayo. En la **Gráfica 1** se representa el porcentaje de la viabilidad celular en función de la concentración de AC (0,25-100µg/mL), normalizado respecto al grupo control sin tratamiento con AC.



Gráfica 1 Ensayo de viabilidad celular por método de MTT resultante de la exposición de 24 horas con concentraciones crecientes de  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ . Para las líneas celulares de HeLa (azul); Fibroblastos 3T3 (Rojo); Glioblastoma 42MGBA (Verde); Neuroblastoma SH-SY5Y (Gris) (n=6). Representación de los valores medios junto con el error estándar (e.e.)

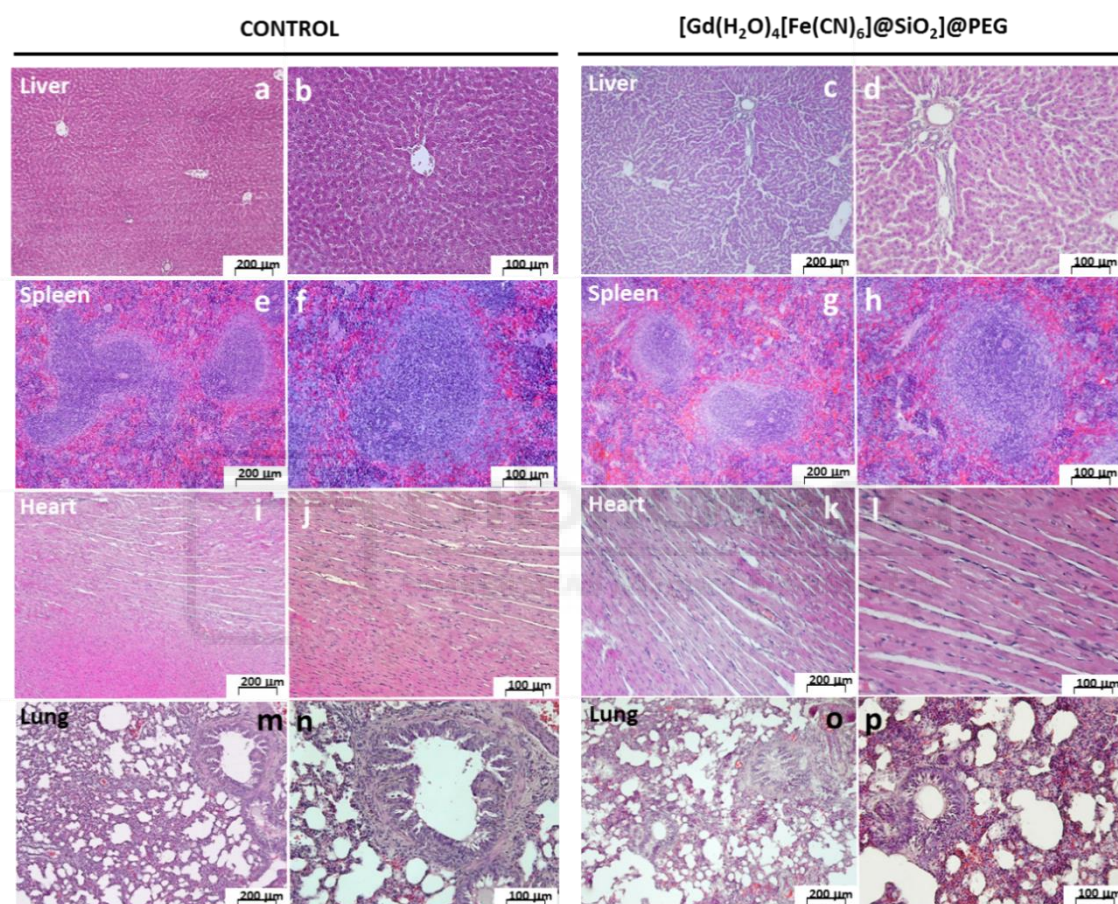
#### 4. Resultados

En la **Gráfica 1** se muestra que las células de Neuroblastoma SH-SY5Y (línea gris) son las menos afectadas por la sustancia de estudio, ya que viabilidad se encuentra entorno al 80% para las concentraciones más altas. Por otro lado, se observa que la variación de la viabilidad celular en el resto de las líneas celulares es muy similar entre ellas, siendo HeLa (línea de color azul) la línea celular más afectada por el AC. No obstante, la disminución de la viabilidad celular observada en estas líneas no es significativamente estadística ( $p\text{-valor}>0,05$ ). Los resultados obtenidos en el ensayo indican que el AC presenta un perfil de biocompatibilidad aceptable [90], dado que la viabilidad celular siempre se mantiene por encima de 70%, excepto en el caso de las células HeLa tratadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como podemos observar en la **Gráfica 1**, el  $\text{IC}_{50}$  de esta molécula no se encuentra en el rango de concentraciones empleadas para el tratamiento de las células (0,25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para poder conocer cuál es la concentración máxima inhibitoria se deberá aumentar la concentración de incubación del AC, tanto para la línea 3T3 de fibroblastos sanos como para las otras tres líneas tumorales utilizadas (HeLa, 42-MG-BA y SH-SY5Y).



## 4.1.2. Ensayo de Biocompatibilidad de AC

El análisis histológico general no muestra daño en los órganos analizados tras la administración intravenosa de 1mL de una suspensión de 5mg/mL, el equivalente a 0,05mmol  $Gd^{3+}$ /kg peso corporal y 0,05mmol  $Fe^{3+}$ /kg peso corporal, de AC recubierto en PEG. Como se puede observar en la **Figura 19**, los órganos analizados de los animales tratados con el AC@PEG y sin tratar (Control) presentan la misma estructura anatómica.



**Figura 19:** Cortes histológicos de órganos de animales tratados y sin tratar con AC teñidos con Hematoxilina/Eosina A-D) Hígado, E-H) Bazo, I-L) Corazón, M-P) Pulmón. Escala 200 $\mu$ m y 100 $\mu$ m.

La histología del hígado (**Figura 19A-D**) no muestra hemorragias en venas ni arterias hepáticas en los animales tratados con AC. Tampoco se observan anomalías en la estructura ni en las células de los lóbulos hepáticos. En el análisis histológico del bazo (**Figura 19E-H**) no se han detectado anomalías en la pulpa roja y blanca, las cuales presentan una estructura normal. La morfología de los nódulos linfáticos del bazo no muestra señales de hemorragias ni de alta actividad del sistema inmune en respuesta al agente exógeno AC. Respecto a la histología del corazón (**Figura 19I-L**), la anatomía de miocardio, pericardio y endocardio se mantuvo intacta tras la administración del AC. Finalmente, los cortes histológicos del pulmón (**Figura 19M-P**) no mostraron señales de fallo pulmonar y las estructuras de los bronquios y los alveolos siguieron

intactas tras la exposición al AC. El recubrimiento del AC con PEG evita el reconocimiento no específico del compuesto por parte del sistema inmune, permitiendo la eliminación del compuesto por la ruta urinaria y biliar.

### 4.2. Estudio de la actividad anticancerígena y toxicidad del profármaco CPT-5ALA

En esta segunda parte del proyecto se ha descrito la actividad anticancerígena y citotóxica del compuesto propuesto en este trabajo para el tratamiento de GBM; el profármaco CPT-5ALA. Concretamente, los ensayos realizados en esta línea de investigación se han centrado en analizar el efecto del profármaco sobre la viabilidad celular y sus efectos sobre la inducción de la apoptosis, tanto en células tumorales como no tumorales. También hemos estudiado su actividad anticancerígena analizando si el fármaco ocasiona cambios en el transcurso del ciclo celular tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. El conjunto de estos estudios nos ha permitido analizar la actividad anticancerígena que presenta el fármaco y la toxicidad que posee para el resto del organismo.

#### 4.2.1. Procedimiento *in vitro*

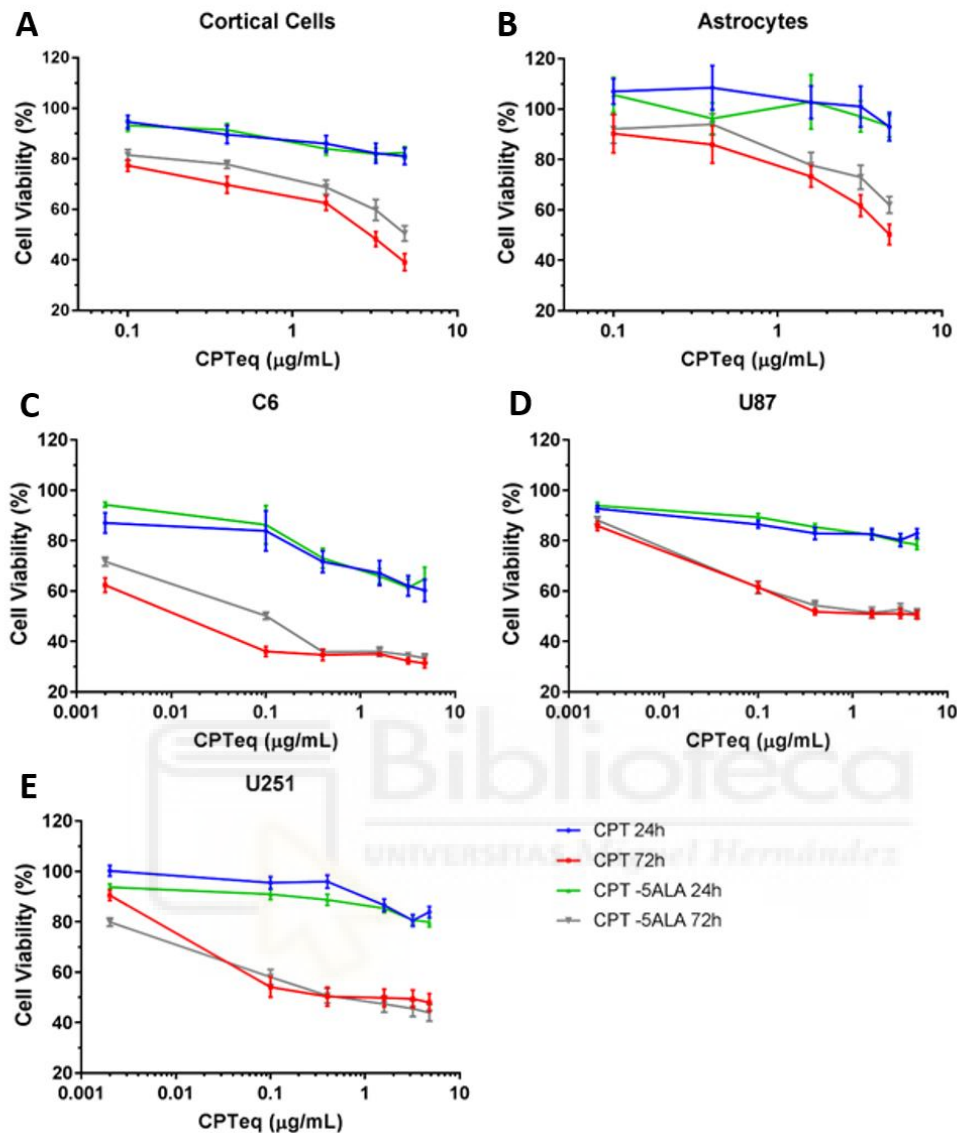
Los estudios *in vitro* de este trabajo han permitido hacer una aproximación del efecto que podría tener el fármaco en el organismo, tanto en las células tumorales proliferativas como en las células corticales sanas. En este apartado se describen los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular, funcionalidad neuronal, apoptosis y ciclo celular en respuesta al tratamiento con CPT-5ALA.

##### 4.2.1.1. Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT

La primera aproximación realizada en este proyecto fue el análisis del efecto del profármaco sobre la viabilidad celular, tanto para las diferentes líneas de GBM como para el cultivo primario de corteza cerebral. El GBM es un tumor que aparece en el SNC, por lo que debemos describir el efecto que puede tener un determinado fármaco en las células que lo componen, principalmente en astrocitos y neuronas. En el caso de ocasionar algún daño neurológico, su administración podría tener graves complicaciones en el paciente, llegando incluso a provocar su muerte.

En este ensayo se estudió la variación de la viabilidad celular en respuesta a la concentración y al tiempo de incubación con CPT-5ALA y CPT, para las líneas celulares de GBM: C6, U251 y U87; y para las células sanas de SNC. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la **Gráfica 2**, donde se representa la viabilidad celular en función de la concentración del tratamiento, tras un tiempo de incubación de 24 y 72 horas.





Gráfica 2: Viabilidad celular en respuesta al tratamiento con CPT-5ALA y CPT durante 24 y 72 horas. A) Células Corticales (n=10); B) Astrocitos (n=10); C) C6 (n=6); D) U87 (n=7); E) U251 (n=7). Células tratadas con 24 horas con CPT (Azul) y CPT-5ALA (Verde); y tratadas 72 horas con CPT (Rojo) y CPT-5ALA (Gris). Representaciones de los valores medios junto con el SEM

En primer lugar, la **Gráfica 2** muestra una disminución de la viabilidad celular en todos los modelos celulares del ensayo al aumentar tanto el tiempo de incubación como la concentración del tratamiento con CPT-5ALA y CPT. En la **Tabla 7** se indican los *p-valor* obtenidos en el análisis estadístico del t-Test al comparar si existen diferencias significativas en la viabilidad celular al aumentar el tiempo de tratamiento de 24 horas a 72 horas para una misma concentración de CPT-5ALA, y al comparar la viabilidad celular obtenida a 72 horas con los dos fármacos del ensayo (CPT-5ALA y CPT).

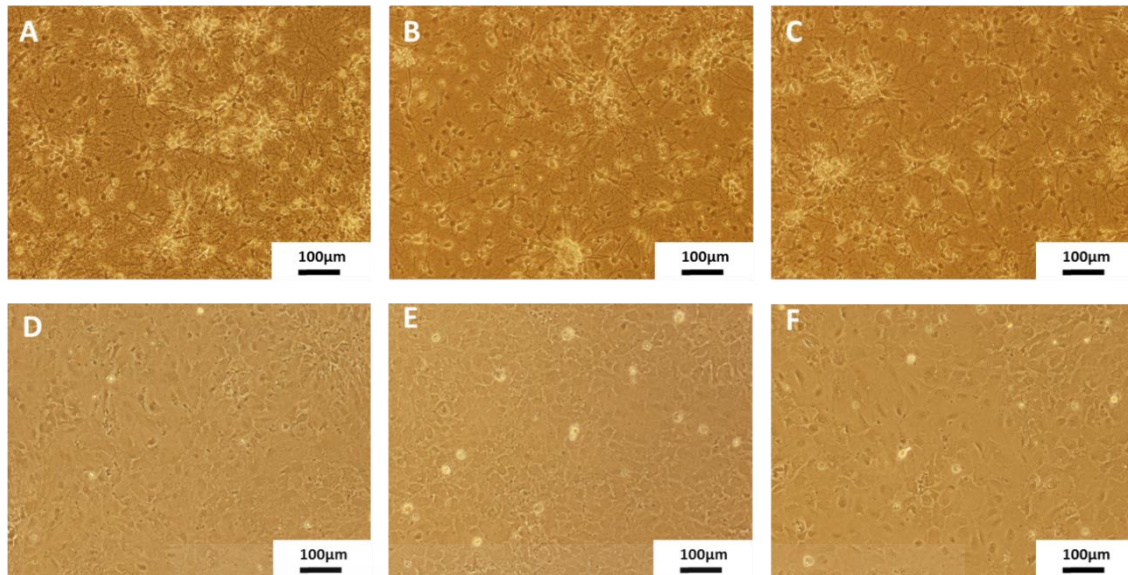
|   | Células corticales            | Astroцитos                   | U87                            | U251                           | C6                              |
|---|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Mortalidad de CPT-5ALA comparando 24h y 72h                   | 0,1 <sub>(p=0,0236)</sub> *   | 3,2 <sub>(p=0,0049)</sub> ** | 0,1 <sub>(p=2,6E-08)</sub> *** | 0,1 <sub>(p=2,3E-06)</sub> *** | 0,1 <sub>(p=2,12E-09)</sub> *** |
| Mortalidad tras 72h de tratamiento, comparando CPT y CPT-5ALA | 0,4 <sub>(p=0,00689)</sub> ** | 4,8 <sub>(p=0,011)</sub> *   | 4,8 <sub>(p=0,8764)</sub>      | 1,6 <sub>(p=0,0262)</sub> *    | 4,8 <sub>(p=0,0505)</sub>       |

**Tabla 7: Concentraciones (CPTeq/mL) con diferencias estadísticamente significativas acompañadas de p-valor correspondiente (p=p-valor) tras comparar la variación de la mortalidad de CPT-5ALA entre 24 horas y 72 horas, y la variación de la mortalidad tras 72 horas de tratamiento con CPT-5ALA y CPT**

La **Tabla 7** nos indica la concentración de CPT-5ALA a partir de la cual hemos detectado diferencias significativas al comparar, en un primer lugar, la mortalidad causada por CPT-5ALA tras 24 y 72 horas de exposición, y en un segundo lugar, la mortalidad causada por ambos compuestos tras 72 horas de exposición, ambas comparaciones para una determinada concentración. Dicha concentración viene seguida por el *p-valor* obtenido en el t-Test para cada situación. En caso de no haber diferencias significativas, como es el caso de la comparativa de la mortalidad ocasionada entre ambos fármacos en las células U87 y C6 tras 72 horas de tratamiento, se indica el *p-valor* obtenido a la concentración de tratamiento más alta, es decir 4,8 (CPTeq µg/mL). Como podemos observar tanto en la **Gráfica 2** como en la **Tabla 7**, la viabilidad celular disminuye cuando aumentamos el tiempo de incubación con el fármaco. Concretamente, en el caso de las líneas de GBM y las células corticales, esta diferencia se hace significativa, *p-valor* <0,001 \*\*\* y *p-valor* <0,05\*, respectivamente, a la concentración de 0,1 µg CPTeq/mL. Mientras que en el caso de los astroцитos no encontramos diferencias significativas hasta alcanzar concentraciones altas de CPT-5ALA, es decir a 3,2 µg CPTeq/mL (*p-valor* <0,01\*\*).

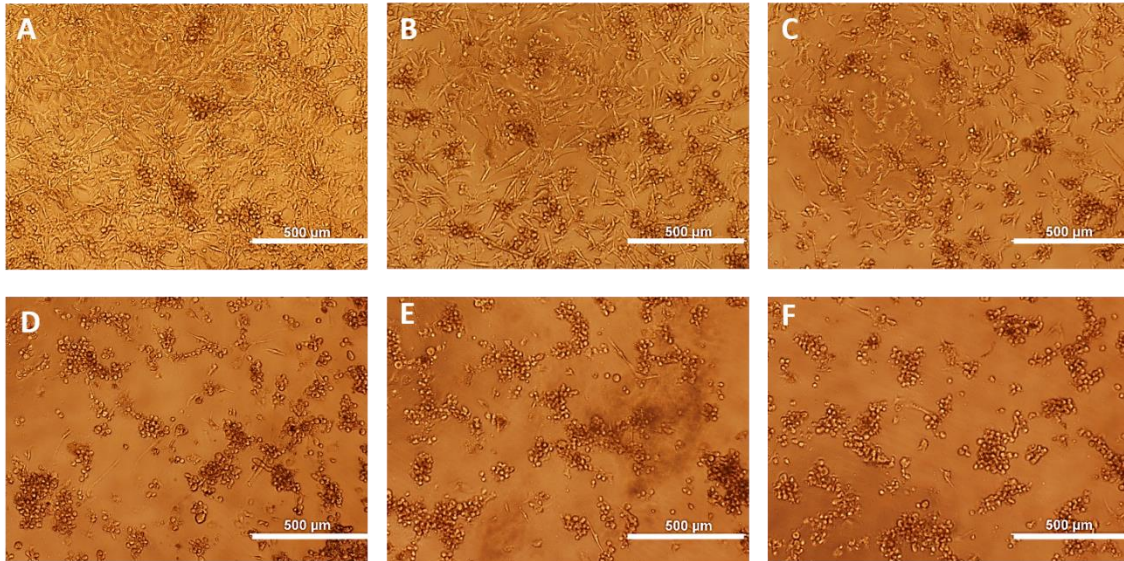
La **Tabla 7** también muestra el resultado de la comparación del efecto de la CPT y CPT-5ALA en la viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento. En este análisis se pretende determinar si ambos fármacos tienen un efecto similar en la viabilidad celular de una determinada línea. Como podemos observar en la **Tabla 7** y en la **Gráfica 2**, en las líneas de GBM C6 y U87 no hay diferencias significativas en la mortalidad celular ocasionada por estos dos fármacos, por lo que podemos decir que tienen el mismo efecto en estas líneas celulares. Por otro lado, en la línea U251 se han encontrado diferencias significativas (*p-valor* <0,05\*) entre la viabilidad celular resultante tras el tratamiento con 1,6 µg CPTeq/mL. A pesar de que la diferencia es mínima, en la gráfica podemos observar que el CPT-5ALA ocasiona mayor mortalidad en estas células. Finalmente, se han encontrado diferencias significativas en la viabilidad de las células corticales tratadas con 0,4 µg CPTeq/mL de CPT y CPT-5ALA (*p-valor* <0,01\*\*). Si observamos la curva de viabilidad de las células corticales tratadas con CPT-5ALA y CPT en la **Gráfica 2**, y las imágenes de campo claro en la **Figura 20**, se muestra que la viabilidad celular tras el tratamiento con CPT-5ALA es mayor que la viabilidad resultante tras el

tratamiento con CPT. Lo que indica que el profármaco CPT-5ALA presenta menos toxicidad para las células corticales que el CPT. Este mismo efecto lo encontramos en el caso de los astrocitos, pero no se observan diferencias significativas hasta concentraciones altas, 4,8  $\mu\text{g}$  CPTeq/mL ( $p$ -valor < 0,05\*).



**Figura 20** Imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fases de células de cultivo primario tratadas 72 horas con CPT-5ALA. Cultivo cortical: A) Control sin tratar; B) 0,4 $\mu\text{g}$  CPTeq/mL; C) 4,8 $\mu\text{g}$  CPTeq/mL. Astrocitos: D) Control sin tratar; E) 0,4 $\mu\text{g}$  CPTeq/mL; F) 4,8 $\mu\text{g}$  CPTeq/mL. Escala 100 $\mu\text{m}$ .

Como se muestra en la **Gráfica 2**, en todos los casos observamos que hay un descenso significativo de la viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento con los fármacos CPT-5ALA y CPT ( $p$ -valor < 0,001 \*\*\*). La disminución de esta variable es significativa en todas las líneas de GBM y de cultivo cortical al tratar con 0,1 $\mu\text{g}$  CPTeq/mL, excepto en el caso de astrocitos donde la diferencia es significativa a partir de 1,6 $\mu\text{g}$  CPTeq/mL ( $p$ -valor < 0,001 \*\*\*). Sin embargo, se puede observar que el aumento de la muerte celular es mucho más atenuado en el caso del cultivo cortical y de los astrocitos, para ambos tipos de tratamiento, que en el caso de las líneas de GBM. Como podemos observar en la **Gráfica 2** y en la **Figura 21**, la viabilidad en las células de GBM desciende rápidamente a consecuencia del tratamiento a concentraciones bajas, como por ejemplo a 0,1 $\mu\text{g}$  CPTeq/mL.



**Figura 21:** Imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fases de células U87 tratadas 72 horas con CPT-5ALA. A) Control sin tratar; B) 0,1µg CPTeq/mL; C) 0,4µg CPTeq/mL; D) 1,6µg CPTeq/mL; E) 3,2µg CPTeq/mL; F) 4,8µg CPTeq/mL. Escala 500µm.

Para cuantificar el efecto del fármaco sobre la variación de la viabilidad celular se calcularon los valores de  $IC_{50}$  de ambos fármacos, los cuales se indican en la **Tabla 8**.

| Tipo celular       | CPT ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CPT-5ALA ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------|
| C6                 | 0,0159                   | 0,0985                        |
| U251               | 1,389                    | 0,9135                        |
| U87                | 2,29                     | 2,77                          |
| Células Corticales | 2,733                    | 7,486                         |
| Astroцитos         | 5,85                     | 7,521                         |

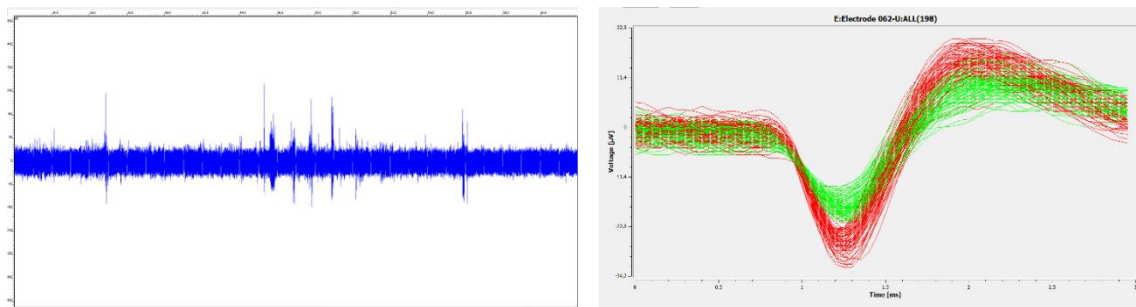
**Tabla 8:** Valores  $IC_{50}$  para CPT y CPT-5ALA (CPT-eq  $\mu\text{g/mL}$ ) para las diferentes líneas de GBM, células corticales y astroцитos tras 72 horas de exposición al fármaco.

En la **Tabla 8** podemos observar que la concentración máxima inhibitoria del profármaco CPT-5ALA es mucho mayor en las células sanas que en las líneas de GBM. En las líneas cancerígenas, el valor de  $IC_{50}$  es similar tanto para la CPT como para el profármaco de CPT-5ALA, y la concentración máxima inhibitoria se alcanza a concentraciones bajas. Por otro lado, los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para las células corticales y los astroцитos corroboran los *p-valor* comentados en la **Tabla 7** y confirman que la toxicidad de CPT en las células corticales ( $IC_{50}=2.733$  CPTeq  $\mu\text{g/mL}$ ) y en las células de astroцитos ( $IC_{50}=5.85$  CPTeq  $\mu\text{g/mL}$ ) es significativamente mayor (*p-valor*<0,05\*) que la citotoxicidad causada por el profármaco CPT-5ALA ( $IC_{50}$  CÉLULAS CORTICALES =7.486 CPTeq  $\mu\text{g/mL}$  ;  $IC_{50}$  ASTROCITOS=7.521 CPTeq  $\mu\text{g/mL}$ ).

En resumen, los resultados del ensayo de viabilidad de MTT nos indica que la muerte celular del cultivo es mayor al aumentar el tiempo de incubación y la concentración del fármaco. También se ha observado que tanto la CPT como la CPT-5ALA ocasionan una mayor mortalidad en las líneas de GBM que en las células de SNC. Asimismo, se ha detectado que el efecto de ambos fármacos es muy similar para las líneas de GBM. Mientras que en el caso de las células de SNC la muerte celular ocasionada por CPT es mayor que la provocada por el profármaco CPT-5ALA.

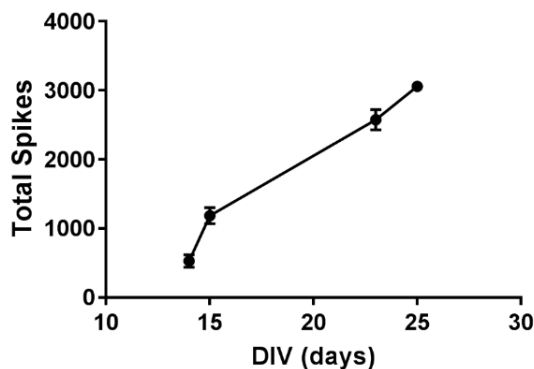
#### 4.2.1.2. Ensayo de Funcionalidad Neuronal

Los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular por MTT nos indicaron que la toxicidad de CPT-5ALA en células de SNC era más baja que la provocada por la CPT. No obstante, este ensayo no nos proporciona información acerca de la funcionalidad neuronal. Con el fin de analizar el efecto de la CPT-5ALA sobre la funcionalidad neuronal, se registró, con un dispositivo MEA, la actividad electrofisiológica espontánea del cultivo celular cortical tratado con cuatro dosis de 3,2 $\mu$ g CPTeq-5ALA/mL. El tratamiento se administró cada 3 días durante dos semanas, simulando las condiciones de tratamiento del experimento *in vivo*. En la **Figura 22 A** se muestra la actividad electrofisiológica ( $\mu$ V) en función del tiempo de registro (ms) a DIV25, el último día de experimento. En la **Figura 22 B** se presenta la actividad electrofisiológica espontánea total en DIV25 registrada por un determinado electrodo del dispositivo MEA durante toda la sesión de registro. Esta imagen corresponde con todos los eventos de potenciales de acción del electrodo tras realizar la clasificación de *spikes* con el programa NeSo.



**Figura 22** Actividad espontánea extracelular ( $\mu$ V) en cultivo de células corticales tras cuatro dosis de 3,2 $\mu$ g CPT-5ALA en DIV25. A) Ventana temporal del registro (ms) B) Clasificación de potenciales de acción en un electrodo.

En la **Gráfica 3** se encuentra la cuantificación de los eventos de potenciales de acción de los registros realizados antes (DIV 14 y 15) y después del tratamiento (DIV23 y 25) con 3,2 $\mu$ g CPTeq-5ALA/mL. La actividad no se ve afectada por el profármaco, ya que la evolución de la tasa de disparo no se desvía de la descrita para este tipo de cultivos [91].



Gráfica 3: Variación de la actividad electrofisiológica de cultivo de células corticales con y sin tratamiento con 3,2µg CPTeq-5ALA/mL (n=5). Representación de valores medios y barras de error (SEM).

La **Gráfica 3** muestra que la actividad electrofisiológica aumenta con el tiempo de incubación del cultivo a pesar del tratamiento a largo plazo con 3,2µg CPTeq-5ALA/mL. Por lo tanto, acorde con los resultados de MTT, el tratamiento a largo plazo con altas dosis de profármaco no compromete la viabilidad y la funcionalidad neuronal.

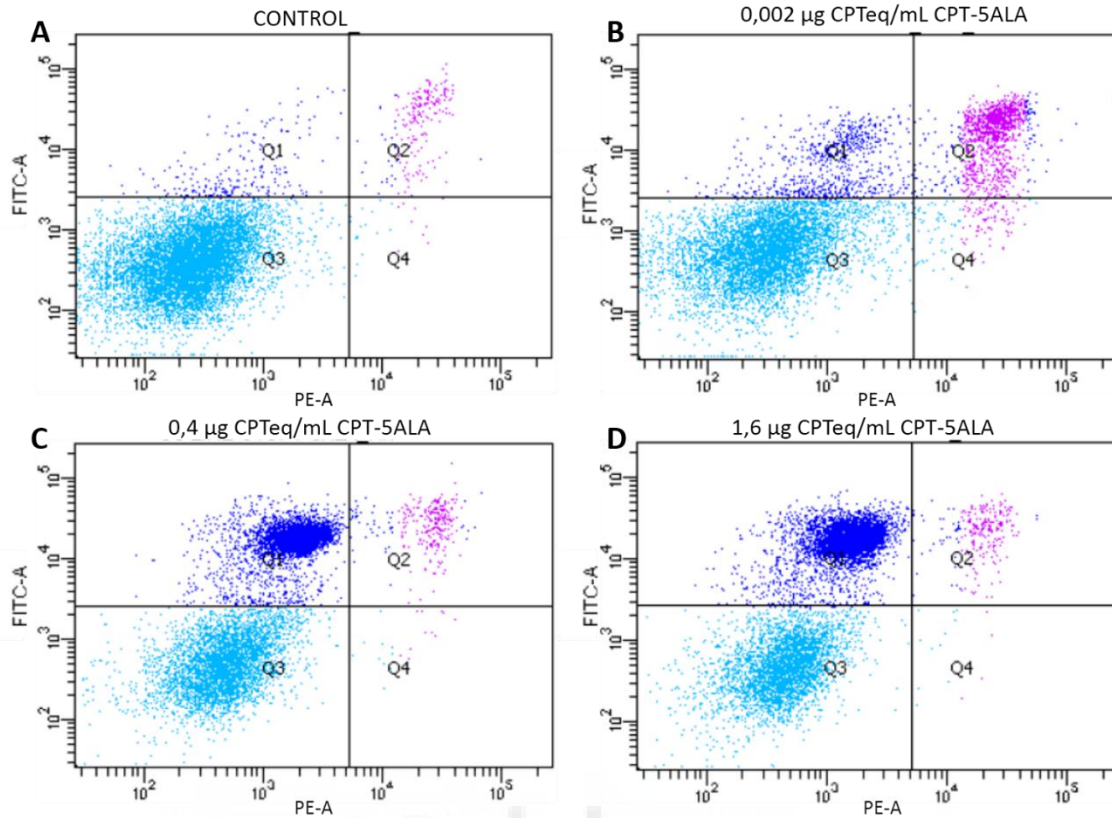
#### 4.2.1.3. Estudios de citometría de flujo

El citómetro de flujo se utilizó para caracterizar la actividad anticancerígena del compuesto CPT-5ALA. Esta herramienta ha permitido describir el mecanismo a partir del cual se genera la muerte detectada en el cultivo celular en el ensayo de MTT y clasificar las células de GBM en función de la fase de ciclo celular en la que se encuentran como resultado del tratamiento con CPT-5ALA.

##### 4.2.1.3.1. Ensayo de apoptosis por marcaje con Anexina V/Ioduro de Propidio

El ensayo de MTT cuantifica la viabilidad en el cultivo celular. Sin embargo, no aporta información sobre cómo se ha producido la muerte celular, la cual puede ocurrir mediante el mecanismo de apoptosis o de necrosis. Este ensayo nos ha permitido clasificar la población del cultivo celular en cuatro poblaciones distintas; células viables, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas. Para ello se realizó un doble marcaje con IP y Annexina-V unida a FITC en células de GBM C6 tratadas durante 24 horas a concentraciones crecientes de CPT-5ALA (0,002-1,6 CPTeq/mL) y se analizó el porcentaje de células contabilizadas en cada uno de los cuadrantes.

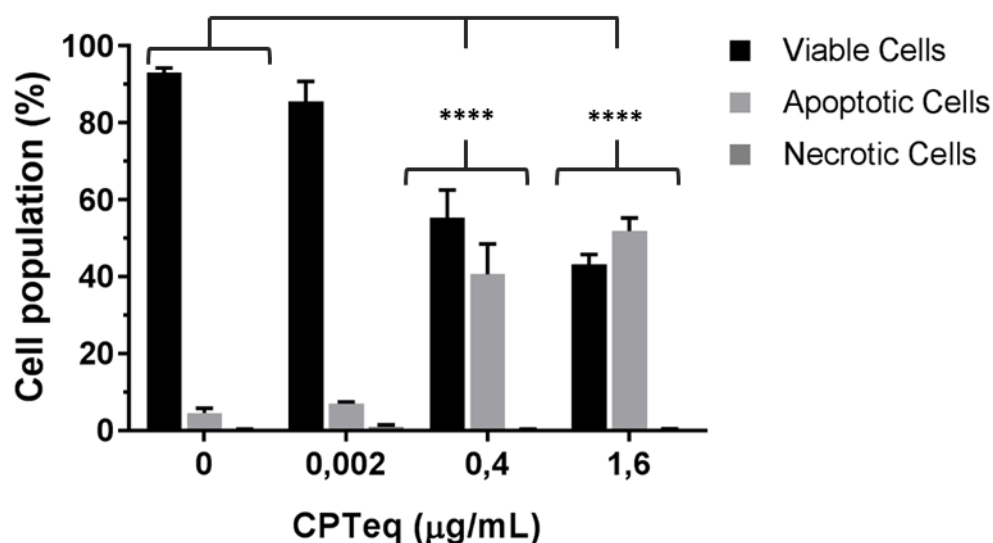
En la **Figura 23** se muestra la dispersión de la población celular en función de la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro de flujo en el filtro PE-A y FITC. El filtro PE-A detecta la fluorescencia emitida por el IP (Eje X), mientras que el FITC detecta la presencia de marcaje de Anexina-V en la célula (Eje Y).



**Figura 23** Cuadro de dispersión de la población de células C6 tratadas durante 24 horas a concentraciones crecientes de CPT-5ALA en función de la fluorescencia en PE-A y FITC (n=4). A) Control sin tratamiento; B) Tratamiento con 0,002 µgCPTeq/mL; C) Tratamiento con 0,4µg CPTeq/mL y D) Tratamiento con 1,6µg CPTeq/mL.

La dispersión de puntos de la población celular se ha dividido en cuatro cuadrantes dependiendo de la fluorescencia detectada en cada célula. El cuadrante Q1 corresponde con las células en apoptosis temprana (Annexina-V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>); el Q2 con las células en apoptosis tardía (Annexina-V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>); el Q3 con las células viables sanas (Annexina-V<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>) y finalmente el Q4 con las células necróticas (Annexina-V<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>). En la **Figura 23** se puede observar cómo cambia la distribución de la población de las células de GBM C6 entre los diferentes cuadrantes en función de la concentración de CPT-5ALA. En el cultivo celular Control, sin tratamiento con CPT-5ALA, la mayor parte de las células se encuentran en el cuadrante Q3, correspondiente a las células viables negativas para el doble marcaje. Mientras que en el cultivo celular de 1,6 CPTeq/mL hay un aumento de las células en Q1, correspondiente a las células en fase de apoptosis temprana con marcaje positivo para Anexina-V pero sin marcar con IP. En este caso, la población celular está distribuida principalmente entre el Q3 de células viables y el Q1. Estos resultados se encuentran cuantificados en la **Gráfica 4**, donde podemos apreciar el aumento significativo (p-valor=0.001 \*\*\*/ p-valor= 6,92· 10<sup>-7</sup>) en el porcentaje de células en apoptosis celular temprana y tardía, correspondiente con Q1 y Q2, al incrementar la concentración de CPT-5ALA, respecto

las células sin tratamiento. También observamos que no hay un aumento significativo de la necrosis al aumentar la concentración de tratamiento.



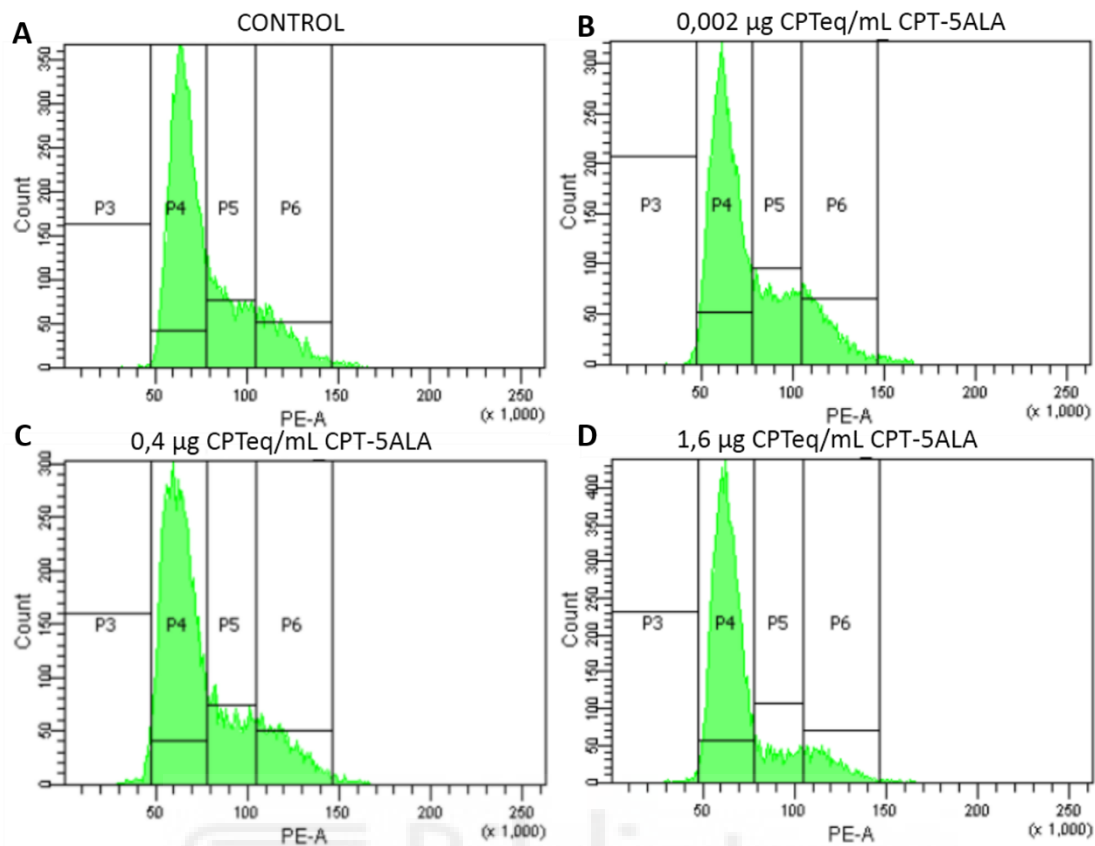
Gráfica 4: Variación del porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas en función de la concentración de CPT-5ALA tras 24 horas de tratamiento (n=4). Representación de los valores medios junto con el error estándar (SEM).

Los resultados obtenidos de este ensayo indican que el profármaco CPT-5ALA comienza a inducir apoptosis en las células de GBM C6 tras 24 horas de incubación. Complementando, de esta manera, la información obtenida del ensayo de MTT y determinando que la muerte celular observada en este ensayo se debe a la inducción de la apoptosis en la célula y no a la necrosis.

#### 4.2.1.3.2. Ensayo de ciclo celular por marcaje con Ioduro de Propidio

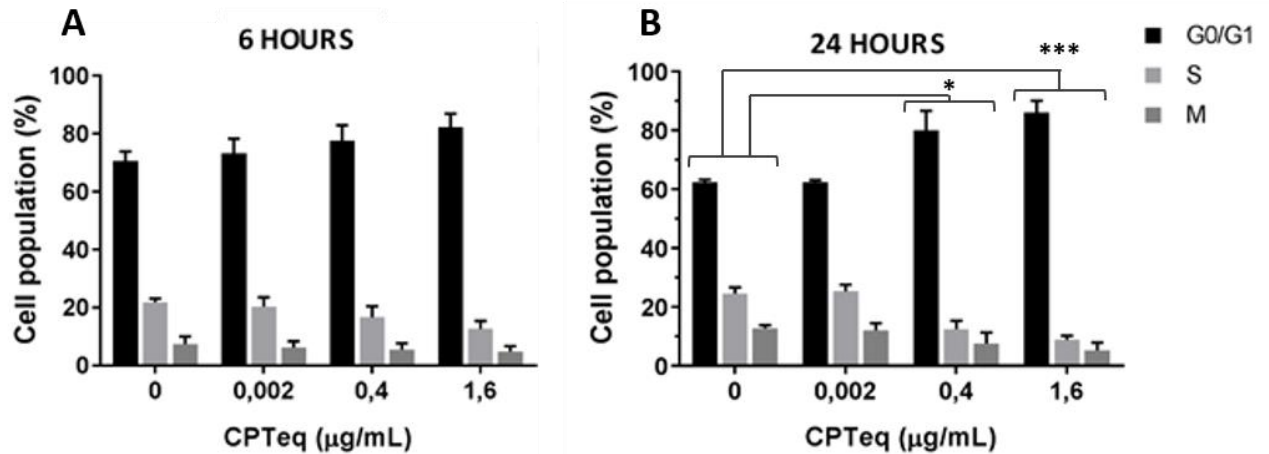
Para evaluar la actividad anticancerígena de los fármacos que interfieren con elementos implicados en el ciclo celular, como es el caso de la inhibición de la Topoisomerasa I de DNA por parte de la CPT, es necesario comprobar si el fármaco afecta a la transición del ciclo celular entre sus diferentes fases. Una de las formas más extendidas de analizar la interferencia de un fármaco en el ciclo celular es determinar qué porcentaje de células hay en cada una de las distintas fases del ciclo celular, y evaluar si existe algún cambio entre el cultivo tratado y sin tratar. En este ensayo las células de GBM de C6 tratadas durante 6 y 24 horas a concentraciones crecientes de profármaco CPT-5ALA se tiñeron con IP, permitiendo determinar la cantidad de DNA en cada célula. En la **Figura 24** se muestra el histograma obtenido de la lectura de la intensidad de la fluorescencia del IP, a partir del cual hemos realizado la clasificación de la población celular entre las diferentes fases del ciclo celular.





**Figura 24:** Histograma de la población de células C6 tratadas durante 24h a concentraciones crecientes de CPT-5ALA en función de la intensidad de fluorescencia en PE-A (n=4). División de la población celular en P4 (G0/G1); P5 (S); P6 (M) A) Control sin tratamiento; B) Tratamiento con 0,002CPTeq/mL; C) Tratamiento con 0,4 CPTeq/mL y D) Tratamiento con 1,6CPTeq/mL.

Como se observa en los histogramas de la **Figura 24**, se han delimitado tres poblaciones en función de la intensidad de fluorescencia de IP. Las cuales se corresponden con las distintas fases del ciclo celular: P4= G0/G1- Fase no proliferativa o latente; P5=S- Fase de Síntesis; P6=M- Fase de Mitosis. En la **Figura 24** podemos observar cómo cambia la distribución de la población celular entre las diferentes fases del ciclo celular al aumentar la concentración del profármaco CPT-5ALA. La cantidad de células en fase S y M disminuye al aumentar la concentración de CPT-5ALA, a la vez que aumenta la cantidad de células en fase no proliferativa G0/G1. En la **Gráfica 5 A y B** se encuentran cuantificados los resultados de la distribución de las poblaciones celulares entre las distintas fases del ciclo celular tras 6 y 24 h de tratamiento, respectivamente.



Gráfica 5: Variación del porcentaje de células en fase G0/G1, S y M en función de la concentración de CPT-5ALA tras A) 6h y B) 24h de tratamiento (n=4). Representación de los valores medios junto con el error estándar (SEM).

En la **Gráfica 5B** podemos observar un aumento del 20%, aproximadamente, del porcentaje de células en fase G0/G1 en la muestra tratada 24 horas con 1,6µg CPTeq/mL en comparación con la muestra no tratada. La población de células en fase S y M disminuye significativamente a concentración de 0,4µg CPTeq/mL (p-valor < 0,5 \* / p-valor=0,0239) y 1,6 µg CPTeq/mL (p-valor < 0,0001 \*\*\* / p-valor= 0,0008) bajo estas condiciones de tratamiento. Sin embargo, en el caso de las células tratadas durante 6 horas con CPT-5ALA no se han encontrado diferencias significativas entre el porcentaje de células en cada fase de ciclo celular al comparar las diferentes concentraciones del experimento (p-valor > 0,05 / p-valor=0,1792). El ensayo de citometría de flujo tras el marcaje del DNA con IP demuestra que el profármaco CPT-5ALA induce un arresto del ciclo celular en la fase latente G0/G1, impidiendo el avance de la progresión del ciclo celular y evitando que las células de GBM C6 entren en fase S y M. Estos resultados también muestran que el número de células en estado proliferativo se reduce al aumentar el tiempo de incubación con el fármaco, ya que el porcentaje de células en fase S y M es mayor a 6 horas que a 24 horas de tratamiento con CPT-5ALA.

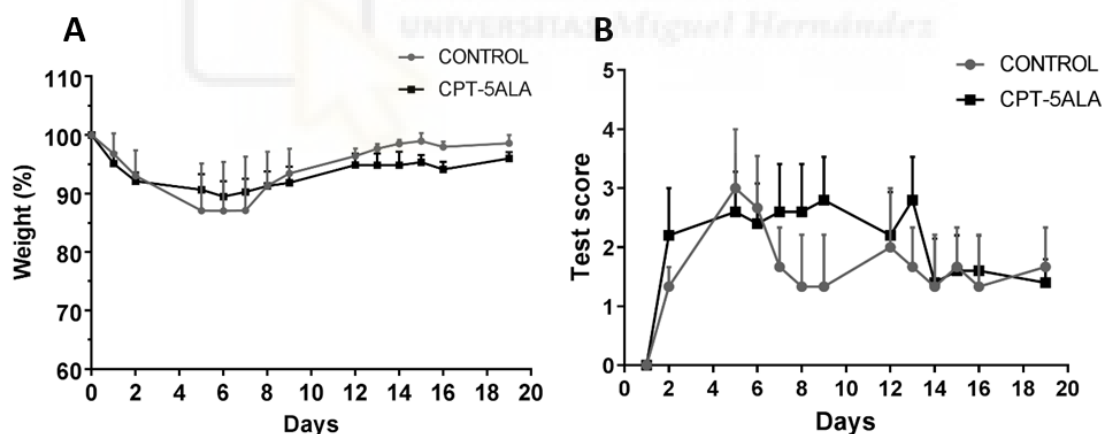
#### 4.2.2. Procedimiento *in vivo*

Los estudios *in vivo* de este trabajo han permitido analizar el efecto que tiene el fármaco en el crecimiento y en el desarrollo del tumor en un modelo intracraneal animal de GBM. En el ensayo *in vivo* se inocularon células C6 de GBM de rata en el núcleo estriado de los animales para desarrollar el tumor. El cual se desarrolló durante 5 días antes de comenzar el tratamiento. En este experimento se trabajó con el Grupo Control tratado con DMSO: PBS (1/3) y el Grupo tratado con 0,8mg CPTeq/kg del profármaco CPT-5ALA. El tratamiento se realizó cada tres días durante dos semanas, administrando cuatro dosis totales a lo largo del experimento.

En este apartado describimos los resultados obtenidos de los ensayos de biocompatibilidad y de la actividad anticancerígena *in vivo* tras la administración intravenosa del CPT-5ALA.

#### 4.2.2.1. Monitorización de los animales y tratamiento con CPT-5ALA

Al trabajar con animales a los que se le ha inoculado un tumor y además se les está testando un nuevo fármaco que desconocemos cómo puede afectar al organismo, es necesario llevar un riguroso control sobre el comportamiento del animal durante todo el ensayo. Para garantizar el bienestar de los animales, se monitorizó diariamente tanto el peso como los signos de dolor a lo largo del experimento. En la **Gráfica 6-A** se muestra la variación del peso corporal del animal a lo largo del experimento, tomando como día 0 el día de la cirugía de inoculación del GBM. Como podemos observar, el peso corporal desciende tras la cirugía en ambos grupos y se recupera a partir del día 8. Durante el resto del experimento, este parámetro se mantuvo constante y en ningún caso la pérdida de peso corporal fue superior al 20% respecto el peso inicial. En la **Gráfica 6-B** se indica el valor medio de la puntuación obtenida en el Test de Supervisión de Morton y Griffiths para cada día del experimento. En ningún animal la puntuación sobrepasó los 10 puntos, indicativo de sufrimiento intenso en el animal.



Gráfica 6 A) Variación del peso corporal de los animales en función del tiempo de experimento. B) Puntuación resultante del Test de Morton y Griffiths en función del tiempo. Grupo Control (n=3) (Gris) y Grupo Tratado (n=5) (Negro). Representación de los valores medios junto con el error estándar (SEM).

Acorde con los criterios establecidos al inicio del experimento, ningún animal superó los 10 puntos del test, por lo que no se sacrificó ningún animal antes de finalizar el tratamiento. Los datos obtenidos del seguimiento del peso y el Test de Morton y Griffiths indican que el animal ha continuado su ingesta normal a pesar de la presencia del tumor y de la administración del fármaco. Por otro lado, el análisis de los signos faciales y del comportamiento motor del animal no indicó dolor ni alteraciones motoras a consecuencia del tumor. Durante el tiempo del

tratamiento, los animales tampoco presentaron señales de algunos de los efectos secundarios más comunes de los fármacos anticancerígenos basados en CPT, como alopecia, hematuria o diarrea.

4.2.2.2. *Ensayo de Biocompatibilidad: Análisis histológico*

El análisis histológico general no muestra daño en los órganos analizados tras la administración intravenosa, dos veces por semana, de 0,8mg CPT-eq/kg del profármaco CPT-5ALA. Como se puede observar en la **Figura 25**, los órganos analizados de los animales tratados con el profármaco CPT-5ALA y sin tratar (Grupo Control) presentan la misma estructura anatómica, a excepción del hígado.

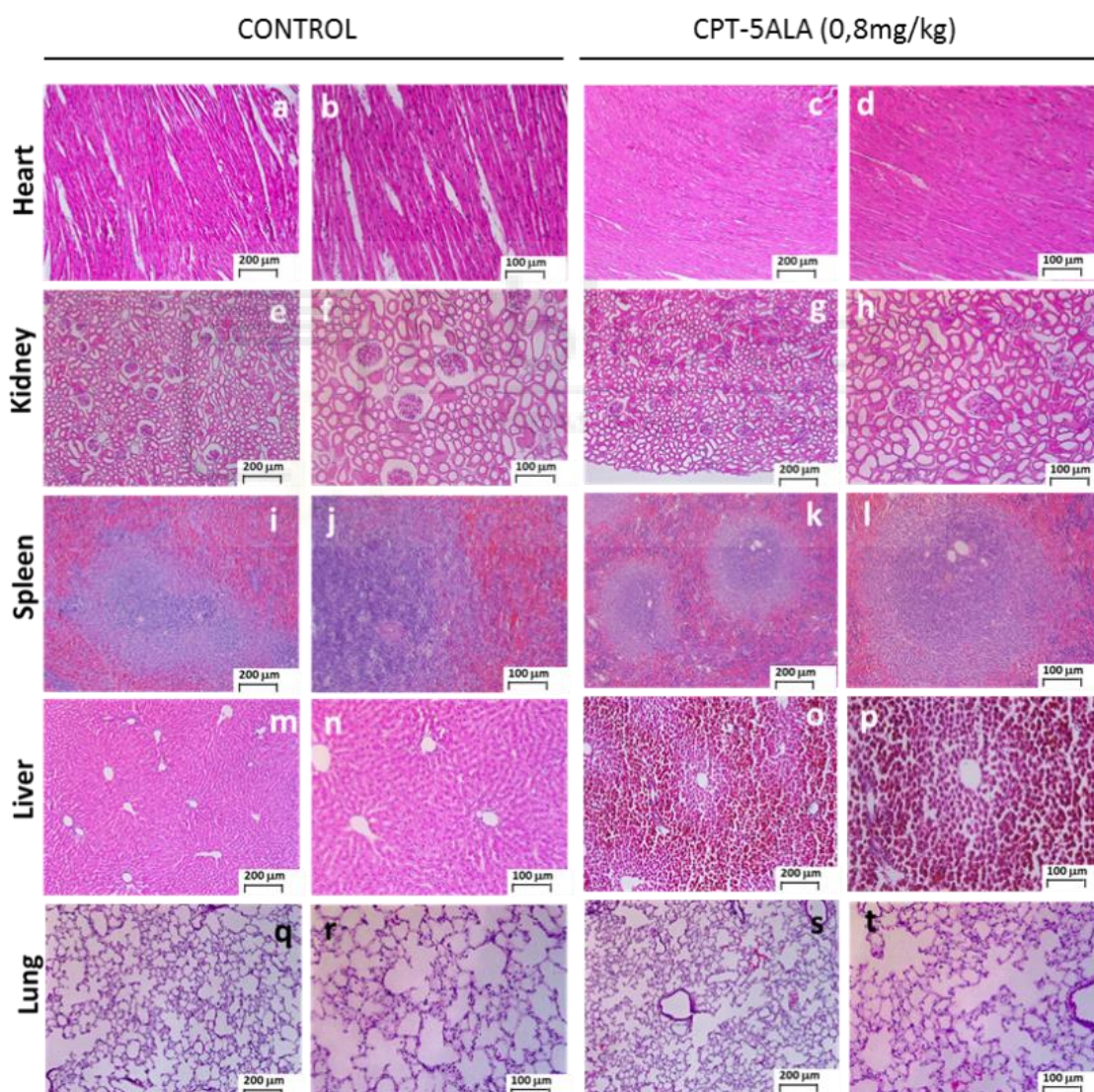


Figura 25: Cortes histológicos de órganos de animales tratados y sin tratar con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA teñidos con Hematoxilina/Eosina. A-D) Corazón, E-H) Riñón, I-L) Bazo, M-P) Hígado Q-T) Pulmón. Escala 200μm y 100μm.

El análisis histológico de los órganos no mostró anomalías estructurales ni celulares en corazón, riñón y bazo de los animales tratados con CPT-5ALA. No se han localizado alteraciones ni hemorragias en todas estas estructuras analizadas en estos órganos. La histología del corazón (**Figura 25 A-D**) no presenta cambios en el miocardio, endocardio y pericardio entre los animales tratados y sin tratar. La histología del riñón (**Figura 25 E-H**) no muestra alteraciones en los corpúsculos renales y los túbulos de la corteza renal entre ambos grupos. Finalmente, el análisis histológico muestra que la morfología del bazo (**Figura 25 I-L**) se mantuvo intacta tras el tratamiento con CPT-5ALA administrado durante dos semanas. No se detectó alta actividad inmune, ni anomalías tanto en la pulpa roja y blanca como en los nódulos linfáticos del tejido.

Los cortes histológicos del hígado (**Figura 25 M-P**) no mostraron hemorragias ni daño en las células ni en la morfología de los lóbulos hepáticos. Sin embargo, se observan alteraciones no significativas en el tejido hepático. Se han detectado áreas del tejido en las cuales las células presentan acumulaciones de pigmentos en su interior en los animales que tratados con 0,8mg CPT-eq/kg del profármaco CPT-5ALA. El hígado de los animales del grupo Control sin tratar con CPT-5ALA no presentan estas zonas pigmentadas. Por último, la histología de los alveolos en el pulmón (**Figura 25 Q-T**) muestra daño agudo en los animales tratados. Sin embargo, el tejido pulmonar no presenta señales de daño crónico, como inflamación o fibrosis.

A pesar de los daños pulmonares observados en el análisis histológico, no se detectaron alteraciones respiratorias en los animales. No presentaron signos de dolor ni angustia, ni complicaciones respiratorias. La ingesta fue la habitual ya que, como hemos visto en *4.2.2.1 Monitorización de los animales y tratamiento con CPT-5ALA*, los animales no redujeron su peso corporal.

### 4.2.2.3. Estudio de la actividad anticancerígena de CPT-5ALA

En este ensayo se ha estudiado la actividad anticancerígena del profármaco CPT-5ALA en los animales donde se generó el modelo de GBM intracraneal mediante las células de la línea C6. El análisis de dicha actividad anticancerígena se ha evaluado tras el tratamiento con 0,8mg CPT-eq/kg del profármaco CPT-5ALA administrado de forma sistémica cada tres días durante dos semanas. Para ello, en primer lugar, se ha comparado el tamaño medio de los tumores de ambos grupos experimentales, y posteriormente, el grado de proliferación de las células del glioblastoma en los dos grupos.

Los resultados de las comparaciones entre el volumen tumoral de los animales tratados con el profármaco CPT-5ALA y sin tratar (Grupo Control) se muestran en la **Figura 26**. La

cuantificación de estas medidas se muestra en la **Gráfica 7-A**, la cual representa el volumen del tumor del grupo tratado normalizado respecto el grupo sin tratar. Estos datos muestran una disminución, significativamente estadística ( $p$ -valor=0,048), del 29,3% en el volumen del tumor en los animales tratados respecto los no tratados, es decir el Grupo Control. Indicando que se frena el crecimiento del tumor al administrar el fármaco. Para obtener una mejor visualización de los datos obtenidos en este experimento, los datos obtenidos en la **Gráfica 7-A** se han representado en 3D en la **Gráfica 7-B**. El análisis histológico en estas muestras no revela indicios de daños morfológicos o hemorragias en el resto de tejido cortical no tumoral tanto en el Grupo Control (**Figura 26 A-C**) como en el Grupo tratado (**Figura 26 D-F**). De la misma manera, tampoco se observan procesos inflamatorios en las meninges.

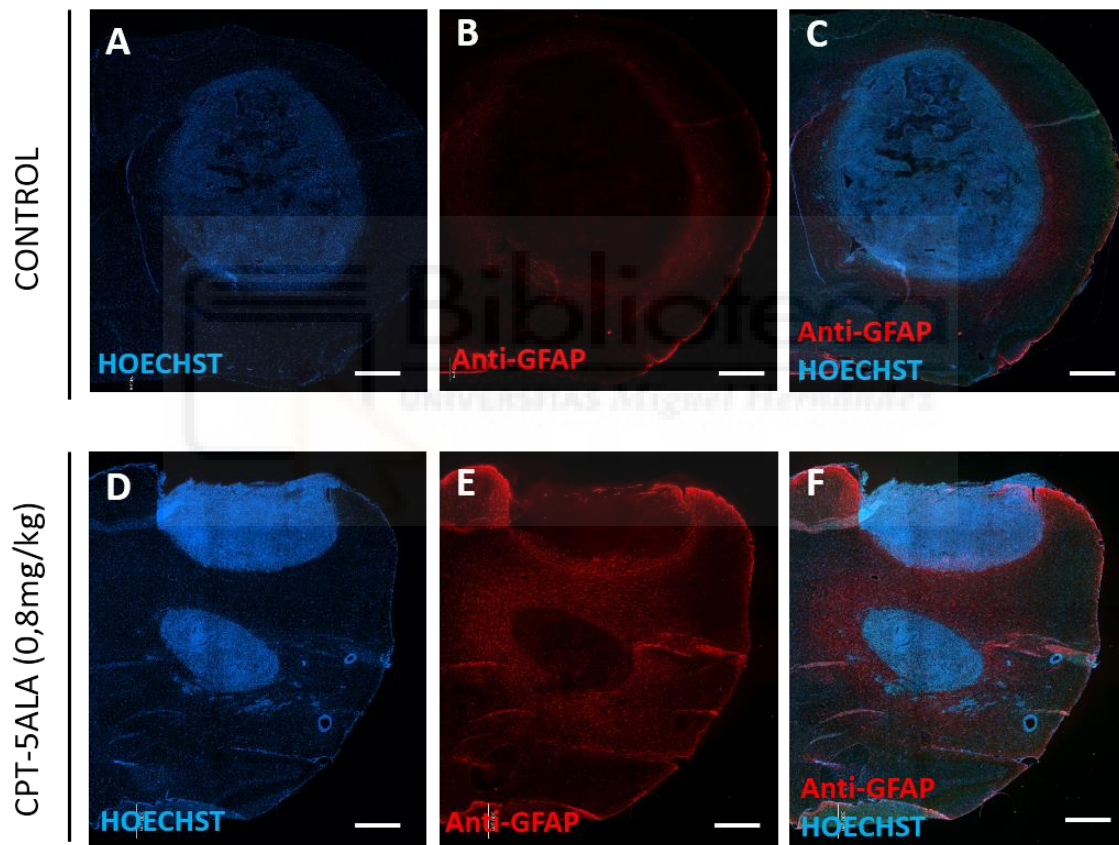
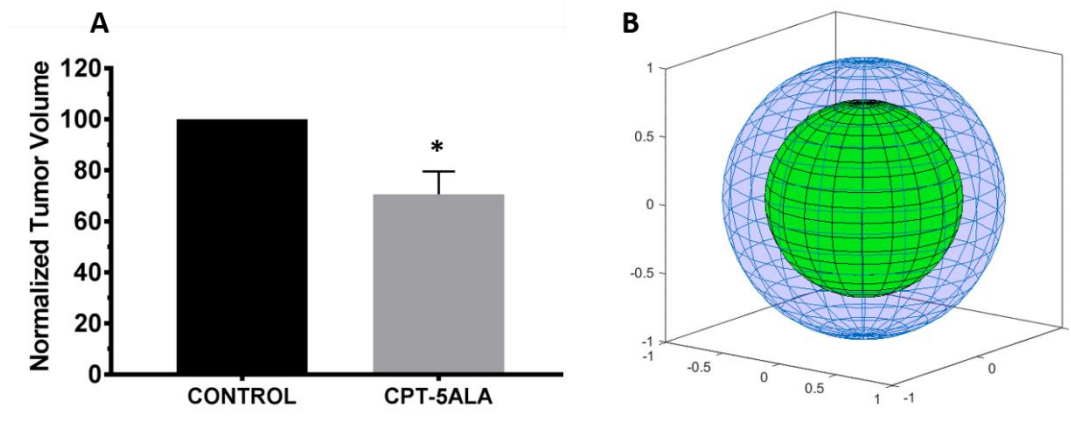


Figura 26: Reconstrucción muestra de tejido cerebral con GBM Animales Control (A-C) y Tratados con 0,8mg CPT-5ALA (D-F). Núcleos marcados con HOECHST (Azul) y Astroцитos con GFAP (Rojo). Escala 1mm.



Gráfica 7: A) Comparación del volumen tumoral normalizado respecto el Grupo Control (n=3) (Negro) y Grupo Tratado (n=5) (Gris). B) Representación 3D del volumen tumoral normalizado. Grupo Control (Azul) y Grupo Tratado (Verde). Representación de los valores medios junto con el error estándar (SEM).

El análisis histológico en los tumores de los animales tratados y sin tratar con el profármaco CPT-5ALA ha demostrado que existen diferencias morfológicas entre los GBM de ambos grupos. Como se muestra en la **Figura 27**, en uno de los animales tratados con la molécula CPT-5ALA el GBM ha derivado a un glioblastoma quístico. La **Figura 27 A y B** muestran la reconstrucción del corte cerebral en la zona del tumor y una imagen del detalle de la lesión, respectivamente. Mientras que en la **Figura 27 C** se muestra la misma sección histológica teñida con Hematoxilina/Eosina. El ensayo inmunohistoquímico de la **Figura 27 A y B** demuestra que las células adyacentes al glioblastoma quístico no son astrocitos, ya que carecen de marcaje con GFAP, característico de este tipo celular. La tinción con Hematoxilina/Eosina de la **Figura 27 C**, muestra que los núcleos de las células que conforman el límite del quiste son alargados y presentan la morfología típica de los fibroblastos.

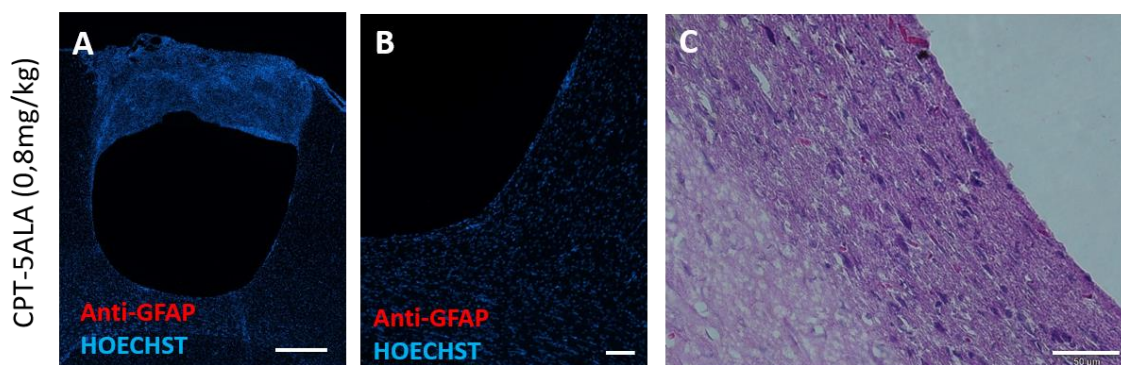


Figura 27 A) Reconstrucción muestra de tejido cerebral con GBM quístico en animal tratado con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Escala 500µm. B) Detalle de límite del GBM quístico. Núcleos marcados con HOECHST (Azul) y Astrocitos con GFAP (Rojo). Escala 100µm. C) Detalle de límite del GBM quístico teñido con Hematoxilina/Eosina. Escala 50µm.

El marcaje inmunohistoquímico de la **Figura 28** sugiere que hay un aumento de la expresión de GFAP, y por tanto de astrocitos activados, en la zona adyacente al tumor en los tumores de los animales tratados con CPT-5ALA **Figura 28 D-F** respecto el grupo control sin tratar **Figura 28 A-C**.

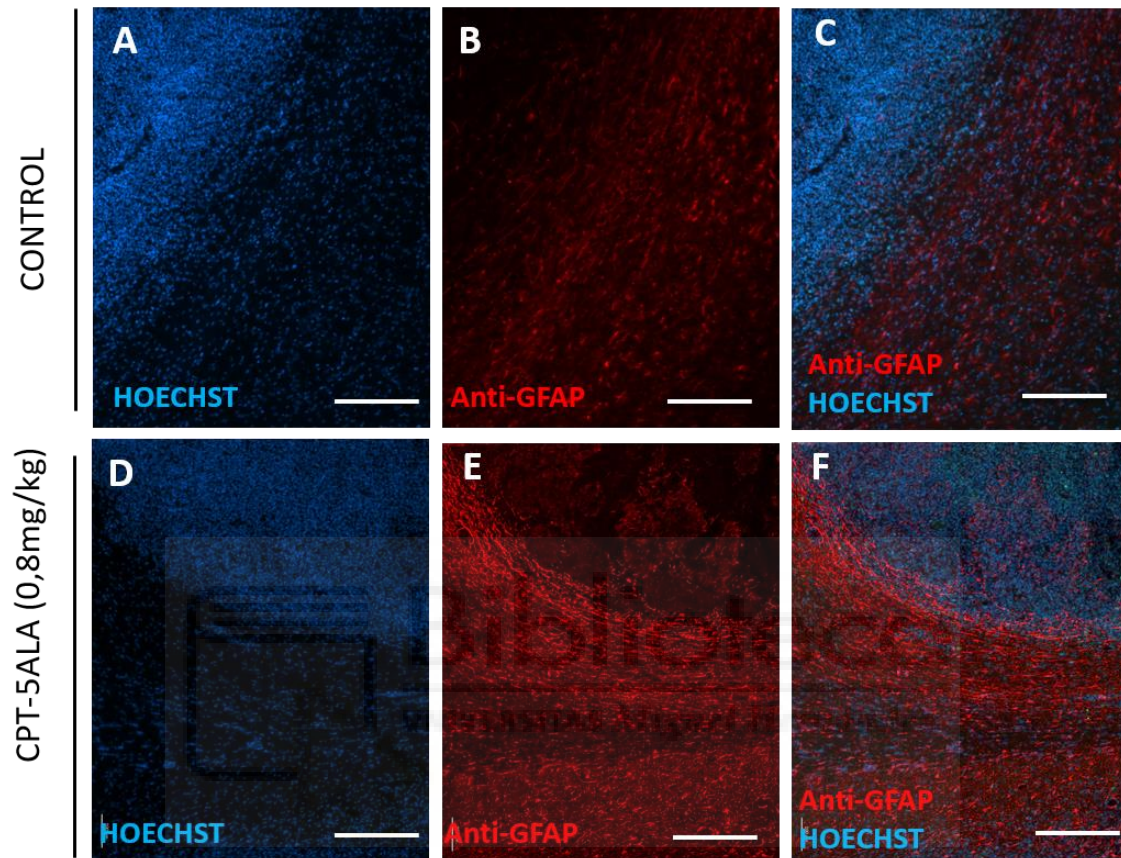
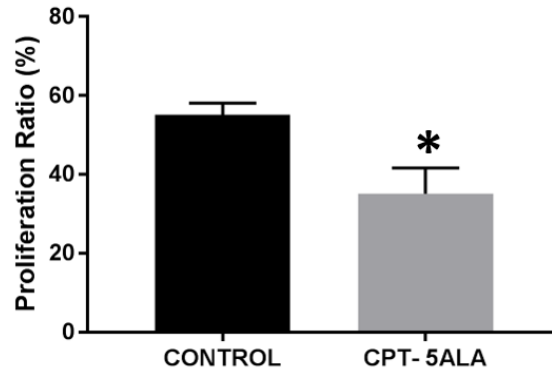


Figura 28: Expresión de GFAP en muestras de tejido cerebral y GBM. Núcleos marcados con HOECHST (Azul) y Astrocitos con GFAP (Rojo). A-C) Animal Control sin tratamiento D-F) Animal Tratado con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Escala 250 $\mu$ m

Finalmente, el ensayo de cuantificación de la proliferación tumoral mediante el marcaje de la expresión de Ki67 en las células de glioblastoma de los cortes histológicos cerebrales se muestra en la **Gráfica 8**. Dicho ensayo indica que las células positivas para la expresión de la proteína Ki67, es decir células en estado proliferativo, disminuye significativamente ( $p$ -valor=0,0298) en respuesta al tratamiento con CPT-5ALA. Los resultados obtenidos en este ensayo indican que la proliferación en el glioblastoma se reduce un 20,01% tras la administración del profármaco.





Gráfica 8: Porcentaje de células proliferativas en el tumor. Grupo Control (n=3) (Negro) y Grupo Tratado (n=5) (Gris). Representación de los valores medios junto con el error estándar (SEM).

Estos datos son consistentes con los datos presentados en el apartado 4.2.1.3.2 *Ensayo de ciclo celular por marcaje con Ioduro de Propidio*, donde se observó que la molécula CPT-5ALA produce arresto del ciclo celular en la fase no proliferativa, es decir en la fase G0/G1. En la **Figura 29** se muestra el resultado del ensayo de proliferación tanto del Grupo Control como el Tratado. El marcaje de la proteína Ki67 se representa de color verde y señala las células en proliferación, mientras que los núcleos celulares se han teñido con HOECHST y se muestran de color azul. En esta **Figura 29** podemos observar la disminución de la proliferación celular en el tumor en respuesta al tratamiento administrado con CPT-5ALA.

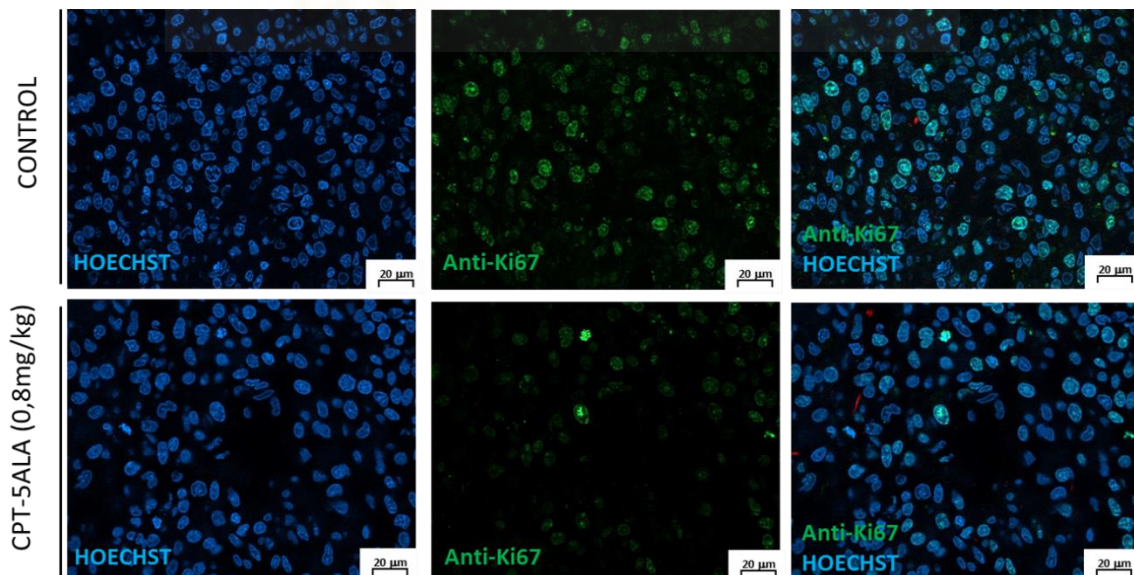
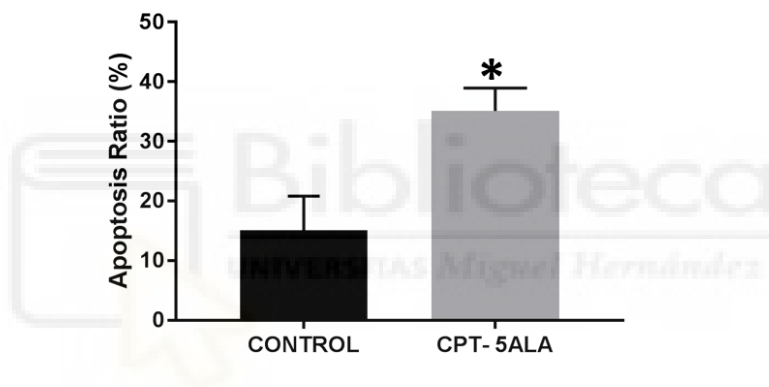


Figura 29: Ensayo de proliferación celular por marcaje de Ki67 (Verde) en el GBM de animales tratados y sin tratar con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Núcleos marcados con HOECHST (Azul). Escala 20µm

#### 4.2.2.4. Ensayo de apoptosis *in vivo* por método TUNEL

Considerando el mecanismo de actuación del profármaco, al interrumpir la síntesis de DNA se debería activar los mecanismos celulares de apoptosis. Este fenómeno ya se ha confirmado anteriormente en los modelos *in vitro*, de modo que en este ensayo estudiamos el efecto de la activación de la apoptosis por parte del profármaco CPT-5ALA en el modelo *in vivo*, utilizando en este caso el marcaje TUNEL. Con el fin de analizar el efecto del fármaco en la apoptosis, en este estudio se ha cuantificado y comparado el grado de apoptosis de las células tumorales en el Grupo Control y el Grupo tratado con 0,8mg CPT-eq/kg del profármaco CPT-5ALA. La cuantificación del ensayo de apoptosis TUNEL realizado en los cortes cerebrales se representa en la **Gráfica 9**. El porcentaje de apoptosis en las células tumorales de los animales del grupo control es de 15,054% mientras que en los animales tratados la apoptosis sube hasta el 35,11%.



**Gráfica 9: Porcentaje de células apoptóticas en el tumor. Grupo Control (n=3) (Negro) y Grupo Tratado (n=5) (Gris).** Representación de los valores medios junto con el error estándar (SEM).

Como también se muestra en la **Figura 30**, estos resultados indican un incremento significativo ( $p$ -valor $>0,05$ / $p$ -valor=0,043\*) en el porcentaje de células apoptóticas en el tumor tras el tratamiento de dos semanas con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA, respecto al grupo sin tratar. En la **Figura 30** se muestra el ensayo de apoptosis de TUNEL en la zona tumoral, tanto del Grupo Control como el Tratado. El marcaje TUNEL se representa de color verde y señala las células en apoptosis, mientras que los núcleos celulares se han teñido con HOECHST y se muestran de color azul.

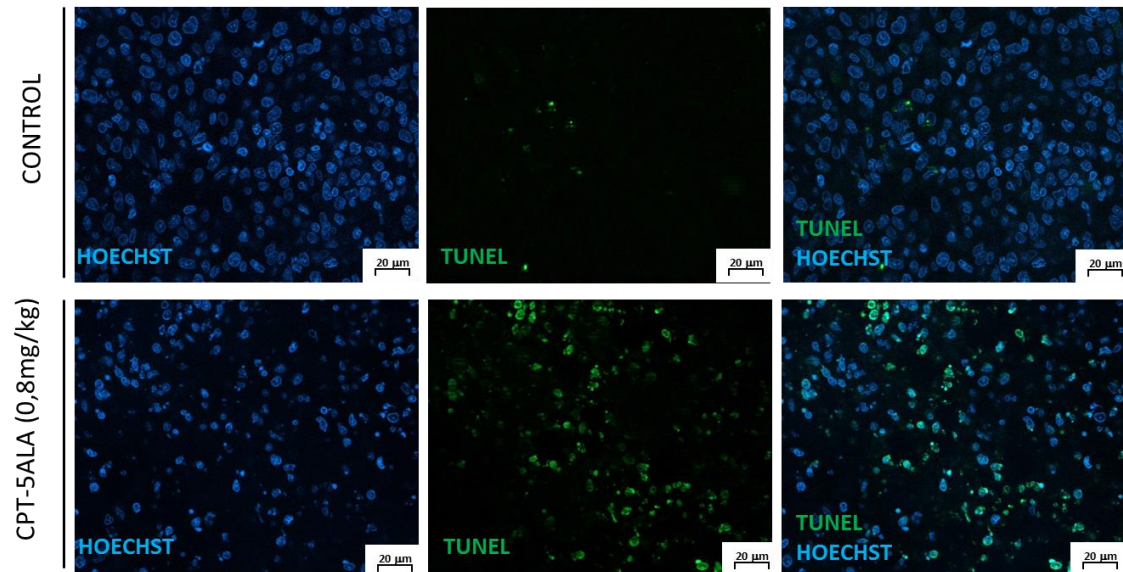


Figura 30: Ensayo de apoptosis por marcaje TUNEL (Verde) en el GBM de animales tratados y sin tratar con 0,8mg CPT-eq/kg de CPT-5ALA. Núcleos marcados con HOECHST (Azul). Escala 20µm

Este ensayo confirma que el número de células de glioblastoma en apoptosis aumenta como consecuencia de la administración del fármaco. Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los obtenidos en 4.2.1.3.1 *Ensayo de apoptosis por marcaje con Annexina V/Ioduro de Propidio*, donde se observó que el profármaco CPT-5ALA induce la apoptosis en las células de glioblastoma C6 tras 24 horas de tratamiento. A pesar del aumento de la apoptosis en las células de GBM, el marcaje TUNEL no reveló un aumento de la apoptosis en el tejido cortical sano de los animales tratados con el profármaco.





Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

# Discusión



## 5. CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

El modelo tumoral utilizado durante este estudio, el glioblastoma multiforme, es el tumor cerebral más común y agresivo. La agresividad que le caracteriza se debe principalmente a la protección otorgada por la barrera hematoencefálica y la alta tasa de proliferación de sus células, que le permiten desarrollarse en cortos periodos de tiempo [92]. Como se ha comentado en el apartado de *Introducción*, la BBB dificulta enormemente el tratamiento de esta enfermedad ya que evita la llegada de muchos fármacos al SNC. Esto obliga a los investigadores a diseñar fármacos que sean capaces de pasar a través de ella [56]. Su rápido desarrollo supone el otro gran inconveniente en su tratamiento. El GBM presenta una evolución muy rápida en un margen de tiempo muy corto ya que la tasa de división de sus células es muy elevada [7]. Debido a esto, en muchos casos, cuando el GBM se diagnostica ya se encuentra en estados avanzados o tardíos, lo cual empeora el pronóstico de la enfermedad. La extirpación quirúrgica en un estadio avanzado es menos completa que en un estadio temprano dado que las infiltraciones del tumor en el tejido sano aumentan con el tiempo. Haciendo más probable la aparición de recurrencia. Por otro lado, el tratamiento por quimio y radioterapia también se vuelve menos efectivo cuando se comienza a tratar el GBM en estadios avanzados. Con el tiempo, las células tumorales van adquiriendo un fenotipo más maligno y resistente a terapia [25]. Por ello, un diagnóstico del tumor en una fase temprana puede mejorar el pronóstico del paciente y aumentar significativamente la esperanza de vida.

A pesar de las décadas de investigación, hoy en día el GBM sigue siendo una enfermedad incurable y con una esperanza de vida muy corta. Concretamente en este trabajo hemos propuesto herramientas que permitan mejorar tanto el proceso de diagnóstico como el de tratamiento del GBM. La primera de estas herramientas consiste en un agente de contraste dual para resonancia magnética con visibilidad en las secuencias  $T_1$  y  $T_2$ . A diferencia de los agentes de contraste utilizados clínicamente en la actualidad, este nuevo agente de contraste contaría con átomos de Gd y Fe, permitiendo la visibilidad en ambas secuencias [20]. Lo que favorecería que el diagnóstico sea más temprano y preciso. La segunda herramienta en la que hemos trabajado en este periodo se centra en el tratamiento quimioterapéutico del GBM y se trata de un nuevo profármaco antineoplásico derivado de la CPT [93].

Uno de los principales problemas que nos encontramos a la hora de desarrollar agentes de contraste duales en las secuencias  $T_1$  y  $T_2$  es que pueden presentar una toxicidad elevada provocada por la liberación de iones de  $Fe^{3+}$  y  $Gd^{3+}$  en el organismo. A pesar de que los AC convencionales utilizados en clínica poseen Fe o Gd, cuando se combinan ambos átomos en una

misma molécula, disminuye su solubilidad en el medio acuoso y en el pH fisiológico. Esto hace que los iones de  $Gd^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  acaben liberándose en el organismo, los cuales pueden llegar a provocar daños en órganos implicados en la eliminación de sustancias, como el riñón. Por ello, el diseño de los AC duales que no presenten toxicidad es una tarea difícil y complicada. En este trabajo presentamos el análisis del estudio de biocompatibilidad de la nanopartícula  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$ .

Como muestra la **Gráfica 1** del apartado 4.1.1 *Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT*, el  $IC_{50}$  del AC no se encuentra entre las concentraciones 0,25-100  $\mu g/mL$ , para las líneas de HeLa, Fibroblastos 3T3, Glioblastoma 42MGBA y Neuroblastoma SH-SY5Y. En ninguno de estos casos la viabilidad celular disminuye al 50% respecto al grupo control sin tratamiento. Las diferencias de viabilidad obtenidas entre las diferentes líneas celulares pueden ser debidas a diferentes ratios de internalización del AC. Se observa que la variación de la viabilidad celular en función de la concentración de AC presenta una cinética similar en las líneas de HeLa, Fibroblastos 3T3 y Glioblastoma 42MGBA. Mientras que en el caso de la línea Neuroblastoma SH-SY5Y, no hay variación de la viabilidad celular en respuesta al incremento de la concentración de AC, excepto a la concentración 100  $\mu g/mL$ , la concentración más alta del ensayo. Esto puede ser debido a que la línea de Neuroblastoma SH-SY5Y posea una tasa de internalización de la nanopartícula de AC menor que el resto de las líneas celulares. Lo que explicaría que esta línea se viera menos afectada por la exposición a AC. A pesar de esta observación, la mortalidad provocada por el AC dual  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2$  no supera, en ningún modelo utilizado, el 30% respecto el grupo sin tratamiento. Por tanto, se encuentra dentro de los límites establecidos de tolerabilidad para garantizar una biocompatibilidad aceptable [90].

En lo que respecta a la administración *in vivo* del compuesto, se ha determinado que el AC dual revestido en PEG no genera daños histológicos en los principales órganos implicados en la acumulación y eliminación de la nanopartícula. La **Figura 19** del apartado 4.1.2. *Ensayo de Biocompatibilidad de AC* nos indica que la morfología del hígado, bazo, corazón y pulmón no muestra cambios a consecuencia de la exposición al  $[Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]@SiO_2]@PEG$ .

De los resultados obtenidos en el estudio de biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* deducimos que el AC dual propuesto en este trabajo presenta un perfil adecuado de biocompatibilidad. Esto indica que el empaquetamiento de la molécula  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$  en una estructura cristalina revestida de nanopartículas de silicato polimerizado, todo ello modificado con cadenas cortas de PEG, estabiliza la molécula en un medio fisiológico [20]. Disminuyendo su toxicidad al evitar la liberación de  $Gd^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  en el organismo. Lo cual supone



una ventaja frente a los otros AC duales desarrollados hasta el momento no biocompatibles [21]. La disposición de los átomos de Gd y Fe en la nanopartícula evita el apantallamiento entre las secuencias  $T_1$  y  $T_2$  y favorece un efecto sinérgico entre los centros magnéticos de Gd y Fe que aumenta la señal de contraste de la imagen de resonancia magnética. El recubrimiento del AC con PEG disminuye el reconocimiento no específico de la molécula por parte del sistema inmune, de modo que se aumenta el tiempo de permanencia en la sangre. Permitiendo que el AC pueda llegar correctamente a todos los tejidos del organismo y finalmente que sea eliminado principalmente por la vía renal mediante la orina y por la vía hepática por la vía biliar [94].

El perfil de bioseguridad del AC sugiere el potencial de este compuesto para su uso clínico como un nuevo agente de contraste dual visible en la secuencia  $T_1$  y  $T_2$ . A pesar de que en este trabajo nos hemos centrado en el AC dual como herramienta para el diagnóstico del GBM, sus aplicaciones no se limitan únicamente al diagnóstico de esta enfermedad. Esta nueva molécula puede llegar a suponer un gran avance en clínica ya que podría utilizarse como herramienta para el diagnóstico de otras muchas enfermedades, incluyendo otros tipos de cánceres.

La segunda parte de este trabajo se centra en la caracterización de un nuevo tratamiento quimioterapéutico del GBM; un nuevo profármaco antineoplásico derivado de la CPT, un inhibidor de la Topoisomerasa I de DNA [93]. Actualmente se utilizan derivados de CPT, como el Irinotecan, para el tratamiento del GBM por su capacidad de traspasar la BHE [69]. El profármaco caracterizado en este trabajo consta de una molécula de CPT unida a otra de 5ALA. Esta modificación aumentaría la selectividad del fármaco, potenciando la internalización del profármaco CPT-5ALA por parte de las células de GBM, véase *sección 1.8 Ruta de biosíntesis de porfirinas y hemo: 5ALA*. Se ha caracterizado la actividad anticancerígena de este nuevo profármaco en modelos *in vitro* e *in vivo*. Estos ensayos han demostrado que el profármaco CPT-5ALA tiene la capacidad de arrestar el ciclo celular de las células de líneas de GBM. Induciendo la apoptosis y la muerte celular en las condiciones experimentales estudiadas. También hemos determinado que el tejido cortical sano adyacente mantiene su funcionalidad tras el tratamiento con CPT-5ALA. Todo ello sin afectar al bienestar de los animales tratados y sin causar daños en el resto del organismo.

En primer lugar, como muestra la **Gráfica 2** del apartado *4.2.1.1 Ensayo de Viabilidad celular por el método de MTT*, existe un incremento de la mortalidad celular dependiente del tiempo de incubación con ambos fármacos de CPT y CPT-5ALA. Este incremento de la mortalidad es común en todas las líneas celulares del estudio y confirma el mecanismo de acción del

profármaco. Las células deben entrar en Fase S de ciclo celular y expresar Topoisomerasa I para, de esta manera, ser susceptibles a la acción de la CPT [62]. De modo que, al incrementar el tiempo de incubación con los fármacos de 24 a 72 horas, la cantidad de células sensibles a la acción del fármaco es mayor. Con el tiempo, la célula avanza en el ciclo celular, aumentando la posibilidad de iniciar la Fase S, donde se expresa la Topoisomerasa I de DNA y donde la célula es sensible al fármaco. Por lo que la cantidad de células sensibles a la acción de la CPT es mayor al aumentar su tiempo de exposición.

Estos resultados también señalan que la mortalidad media provocada tanto por la CPT como por la CPT-5ALA es significativamente mayor en las líneas de GBM ( $IC_{50} \text{ CPT PROMEDIO}=1,23 \text{ CPTeq } \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50} \text{ CPT-5ALA PROMEDIO}=1,26 \text{ CPTeq } \mu\text{g/mL}$ ) que en las células sanas de astrocitos y células corticales ( $IC_{50} \text{ CPT PROMEDIO}=4,292 \text{ CPTeq } \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50} \text{ CPT-5ALA PROMEDIO}=7,5 \text{ CPTeq } \mu\text{g/mL}$ ). Esto demuestra que las células de GBM son más sensibles al efecto de la CPT debido a que su tasa de división celular es más alta que la tasa de división de las células sanas de los cultivos primarios de corteza cerebral y de astrocitos. El número de células con expresión de Topoisomerasa I de DNA es mayor en las líneas de glioblastoma, más sensibles a estos fármacos, que en las células de cultivo primario. Donde la cantidad de células de en fase no proliferativa o latente (G0/G1) es mayor que las células en fase S.

El análisis del  $IC_{50}$  de ambos fármacos en las líneas tumorales y en las células sanas, indican que ambos fármacos afectan por igual a las células de GBM, ya que el valor promedio de  $IC_{50}$  de ambos fármacos en las tres líneas utilizadas es muy cercano. Mientras que el efecto de los fármacos sobre los cultivos de células sanas de corteza cerebral y de astrocitos difiere entre la CPT y la CPT-5ALA. El valor promedio de  $IC_{50}$  de la CPT para ambos tipos de cultivos primarios ( $IC_{50} \text{ CPT MEDIO}=4,292 \text{ CPTeq } \mu\text{g/mL}$ ) es menor que el valor obtenido para la CPT-5ALA ( $IC_{50} \text{ CPT-5ALA MEDIO}=7,5 \text{ CPTeq } \mu\text{g/mL}$ ). Siendo la CPT 1,75 veces más tóxica para las células corticales sanas que la CPT-5ALA. Este resultado indica que la adición de la molécula de 5ALA a la CPT disminuye la toxicidad del fármaco respecto al original sin modificar. Puede haber varias razones que expliquen este fenómeno. La principal razón es que, tal y cómo se ha postulado anteriormente, la molécula de 5ALA en el profármaco actúa como molécula directora dirigiendo el profármaco hacia células con alto consumo de 5ALA, como son las células de GBM [75]. En consecuencia, se disminuye la internalización del profármaco en las células con poco consumo de 5ALA, como son las células corticales. Reduciendo, de esta manera, la toxicidad de CPT-5ALA respecto la CPT en estas células. Esta hipótesis también explicaría por qué ambos fármacos tienen un  $IC_{50}$  similar en las líneas de GBM. Al tratarse de células con un elevado consumo de 5ALA, la cantidad de fármaco internalizada en el caso de la CPT y en el caso del profármaco de CPT-5ALA es similar.

Por tanto, la concentración de CPT en el medio intracelular será parecida en ambos casos, independientemente de haber tratado con CPT o con CPT-5ALA. Mientras que, en el caso del cultivo primario, la concentración de CPT en el interior celular es mayor tras el tratamiento con la CPT que con el profármaco de CPT-5ALA.

La disminución de la toxicidad de la CPT al añadirle la molécula de 5ALA y el aumento de su selectividad por las células de GBM puede llegar a tener prometedoras aplicaciones clínicas. Una de las limitaciones de los derivados de CPT actuales es que no son específicos de células tumorales, y afectan a muchos tipos diferentes de células sanas en división. Por ello presentan efectos secundarios muy diversos. Algunos de los cuales, como la inmunosupresión, pueden llegar a ser graves [95]. El aumento de la selectividad de la CPT gracias al 5ALA podría permitir aumentar las dosis administradas de profármaco de CPT en el tratamiento de GBM, respecto a la dosis de Irinotecan utilizadas actualmente. Permitiendo un tratamiento más agresivo del GBM. De esta manera, la concentración de CPT intracelular en las células de GBM sería mayor en el caso del profármaco que en el caso del Irinotecan, y menor en las células con bajo consumo de 5ALA. Esto podría suponer una mejora respecto al tratamiento actual del GBM, minimizando los daños en el resto del organismo.

Los resultados obtenidos en los ensayos de MTT han sido apoyados y contrastados por otros ensayos *in vitro*. Uno de los problemas de la técnica de MTT es que sólo informa de la viabilidad celular. Sin embargo, no proporciona información sobre la funcionalidad de las células ni sobre el tipo de muerte celular del cultivo. Por esta razón, se analizó el efecto del tratamiento prolongado con CPT-5ALA sobre la funcionalidad de las neuronas del cultivo de células corticales. Simulando el tratamiento administrado en el experimento *in vivo*. Como se muestra en la **Figura 22** del apartado 4.2.1.2 *Ensayo de funcionalidad Neuronal*, los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el cultivo conserva su actividad electrofisiológica espontánea tras el tratamiento de dos semanas con CPT-5ALA (3,2ng CPTeq/mL). Como se indica en los resultados, la actividad electrofisiológica del cultivo aumenta a lo largo del experimento, independientemente del tratamiento. Esto, probablemente, se debe al desarrollo y a la generación de nuevas de conexiones neuronales entre las neuronas del cultivo [91]. Los resultados obtenidos en este ensayo han permitido concluir que el profármaco CPT-5ALA no afecta a la funcionalidad neuronal. La cual se mantiene tras un tratamiento prolongado con el fármaco. De este ensayo también podemos concluir que el fármaco no supone un obstáculo para el proceso de plasticidad y la generación de nuevas conexiones neuronales, ya que la actividad electrofisiológica del cultivo aumenta con el tiempo.

Los ensayos de citometría de flujo respaldan, junto con el estudio de la actividad electrofisiológica, los resultados obtenidos en los ensayos de MTT. Estos ensayos han permitido analizar el tipo de muerte celular ocurrida en el cultivo en respuesta al tratamiento con CPT-5ALA y el efecto del fármaco en el transcurso del ciclo celular. Los resultados aquí obtenidos apoyan la hipótesis de la posible actividad anticancerígena de CPT-5ALA, ya que muestran que el fármaco provoca el arresto del ciclo celular e induce la apoptosis en las células C6 de glioblastoma de rata. La CPT impide la replicación de DNA durante la fase S de ciclo celular, mediante la inhibición de la Topoisomerasa I de DNA [62]. Provocando un arresto del ciclo celular en la fase S e impidiendo su progresión. La inhibición de la Topoisomerasa I de DNA causa roturas en el DNA y finalmente activa la cascada de apoptosis en la célula [96]. Como se puede observar en la **Gráfica 5** del 4.2.1.3.2. *Ensayo de ciclo celular por marcaje con Ioduro de Propidio*, el porcentaje de células en la fase no proliferativa G0/G1 aumenta en función de la dosis de CPT-5ALA tras 24 horas de exposición. A la vez que la población de células en Fase S y M disminuye, a consecuencia del aumento de la concentración de CPT. En el ensayo de apoptosis se observa un aumento del marcaje con Anexina-V al incrementar la concentración de fármaco, confirmándose que, tras el arresto del ciclo celular provocado por CPT-5ALA, se produce una desestabilización de la estructura de DNA y las células de C6 activan la cascada de apoptosis. Existe un aumento significativo de la apoptosis en las células C6 en función de la concentración de CPT-5ALA tras 24 horas de exposición. Las células en apoptosis se corresponderían con aquellas células que han iniciado la fase S durante el tiempo de exposición al fármaco, y por tanto son susceptibles a la acción del fármaco. Como se indica en la **Gráfica 4** del apartado 4.2.1.3.1. *Ensayo de apoptosis por marcaje con AnexinaV/Ioduro de Propidio*, en este ensayo se demuestra que la disminución de la viabilidad celular observada en el ensayo de MTT es debida a apoptosis y no a necrosis.

El conjunto de los ensayos realizados en la parte de la caracterización *in vitro* del profármaco de CPT ha permitido analizar la capacidad anticancerígena de CPT-5ALA en comparación con la CPT. Se ha determinado que el IC<sub>50</sub> de ambas moléculas es similar en las células de Glioblastoma. Mientras que en las células corticales el IC<sub>50</sub> de la CPT-5ALA es 1,75 veces mayor que el IC<sub>50</sub> de la CPT. La adición de la 5ALA al fármaco ha permitido minimizar su toxicidad en las células corticales sanas. A raíz de estos ensayos también se ha determinado que el profármaco CPT-5ALA no interfiere en la actividad electrofisiológica espontánea ni a la plasticidad neuronal. Lo cual es un dato muy importante, dado que, al tratarse de un tumor del SNC, es necesario que el fármaco administrado no ocasione daño neuronal en el paciente. Finalmente, los ensayos de citometría de flujo nos han permitido concluir que la CPT-5ALA evita

la síntesis de DNA durante el proceso de replicación y, en consecuencia, induce la apoptosis de las células de GBM. En este sentido, las células de este tumor son altamente proliferativas [7], lo cual las hace más sensibles a la acción de la CPT que otros tumores menos proliferativos. Por esta razón consideramos que la CPT presenta un alto potencial en el tratamiento del GBM, tal y como se está demostrando en los ensayos clínicos con Irinotecan [70]. Una buena forma de enfocar el tratamiento del GBM es dirigir los fármacos a las células tumorales. De modo que se pueda aumentar la concentración de los agentes quimioterapéuticos sin comprometer al resto del organismo y minimizando los efectos secundarios. En este contexto, los resultados obtenidos indican que la unión de la CPT a la molécula de 5ALA ha sido una buena estrategia para reducir la toxicidad de la CPT original.

Una vez caracterizada la actividad *in vitro* del profármaco, se procedió a analizar su efecto *in vivo*. El comportamiento del tumor en el organismo difiere enormemente del comportamiento de las células tumorales en el cultivo celular. Ya que hay muchas condiciones, como el microentorno tumoral o las interacciones con otros tipos celulares, que no están recreadas en el cultivo celular [97]. Esto hace que muchos de los fármacos anticancerígenos tengan una alta actividad antitumoral en condiciones *in vitro*, pero baja actividad cuando se analizan en condiciones fisiológicas. Por ello se estudió la actividad antitumoral del profármaco en un modelo intracraneal de GBM de rata, así como su toxicidad en el resto de los órganos. La dosis y la frecuencia de la administración del profármaco se determinaron mediante estudios realizados anteriormente con CPT [72].

En primer lugar, se observó que durante las dos semanas de tratamiento con CPT-5ALA (0,8mg CPTeq/kg) los animales no presentaron signos de malestar. Tampoco mostraron los efectos secundarios característicos de los otros derivados de la CPT, como el Topotecan y el Irinotecan. Con frecuencia, el tratamiento con estos fármacos provoca falta de apetito, diarrea y alopecia [98], [99]. Efectos que no fueron detectados en los animales del experimento ya que, como se observa en la **Gráfica 6** del apartado 4.2.2.1 *Monitorización de los animales y tratamiento con CPT-5ALA*, no disminuyeron de peso y la puntuación del Test de Morton y Griffiths muestra un nivel alto de bienestar. En la **Gráfica 6 A** se observa que hay una disminución en el peso de los animales de ambos grupos durante los días posteriores a la cirugía de inoculación del tumor. Probablemente esto se deba a que los animales reducen la ingesta a consecuencia de la administración de la analgesia, Buprex, que puede ocasionar somnolencia y falta de apetito. Por otro lado, puede que la modificación con 5ALA mejore la selectividad de la CPT por las células de glioblastoma y reduzca captación de CPT en otros tejidos proliferativos, como es el folículo piloso. De ser así, con esta modificación, reduciríamos los efectos secundarios

asociados a los otros derivados de CPT que no poseen moléculas directoras, como la inmunosupresión y la alopecia.

El análisis histológico de los órganos de los animales tratados durante dos semanas indicó que no existe toxicidad de CPT-5ALA hacia el riñón, bazo y corazón. Como muestra la **Figura 25** del apartado 4.2.2.2. *Ensayo de biocompatibilidad: Análisis histológico*, en estos órganos no se detectó ningún tipo de señal indicativa de daño tisular. Sin embargo, la histología del hígado de los animales tratados con CPT-5ALA mostró la existencia de depósitos de pigmentos en el interior de los hepatocitos. Probablemente, estos depósitos se correspondan con acumulaciones de protoporfirina y hemo en el citoplasma de los hepatocitos [100]. Tras la administración de 5ALA inducimos la síntesis de PpIX y en consecuencia de hemo, que se degrada principalmente en el hígado a través de la ruta biliar. Esta acumulación aumentaría la expresión de enzimas implicadas en la ruta biliar, encargadas de la degradación de protoporfirinas y hemo. No obstante, esta alteración es inocua tanto para el hígado como para el organismo [100]. Por otro lado, el análisis histológico reveló alteraciones en los alveolos pulmonares a consecuencia de la administración de CPT-5ALA. A pesar de estas alteraciones, los animales tratados con CPT-5ALA no presentaron síntomas de problemas respiratorios durante el tiempo del tratamiento. Sin embargo, en el futuro sería necesario realizar ensayos que permitan caracterizar cómo afectan estos cambios al animal y si pueden llegar a suponer un problema respiratorio grave a largo plazo.

Los datos recogidos tras el estudio de la histología de los animales tratados con profármaco CPT-5ALA (0,8mg/mL) durante dos semanas revelan que el profármaco puede presentar ciertos efectos secundarios similares a los descritos para Irinotecan y Topotecan. Ya que, según el Vademécum, la administración de estos medicamentos se relaciona frecuentemente con problemas respiratorios en el paciente, como la disnea [101]. A excepción del hígado, donde hemos encontrado acumulaciones de depósitos de hemo y PpIX como consecuencia de la administración de 5ALA [100]. En este sentido, podemos concluir que el profármaco CPT-5ALA se comporta de forma similar al 5ALA aceptado para uso clínico.

Finalmente, el análisis de la actividad anticancerígena de CPT-5ALA en el modelo intracraneal de GBM nos revela que existen diferencias entre los animales tratados y sin tratar. Corroborando los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*. Estos resultados apoyan la actividad anticancerígena observada en los ensayos *in vitro*. En las **Gráficas 7 y 8** del apartado 4.2.2.3. *Estudio de la actividad anticancerígena de CPT-5ALA*, se observa que hay una reducción en el volumen y en la proliferación del GBM tras el tratamiento de dos semanas con CPT-5ALA

(0,8mg/kg). Indicando que el profármaco reduce la velocidad de crecimiento y de desarrollo del GBM al inhibir la proliferación celular en el tumor. Los resultados mostrados en la **Gráfica 9** del apartado 4.2.2.4. *Ensayo de apoptosis in vivo por método TUNEL* también revelan que el nivel de apoptosis en el tumor es un 15% mayor en los animales tratados con CPT-5ALA que en los animales no tratados. Mientras que no se ha observado un aumento de la apoptosis en el resto del tejido cortical. Apoyando la hipótesis inicial de que, tras la inhibición de la Topoisomerasa I de DNA durante la replicación, las células de GBM inician la activación de la ruta de apoptosis.

Por otro lado, en este ensayo también se observa que se produce un aumento de la expresión de GFAP en los astrocitos adyacentes del tumor tras la administración de CPT-5ALA. Lo cual puede indicar que se está llevando a cabo un proceso de reclutamiento de astrocitos que podrían originar cicatriz glial y, en consecuencia, una encapsulación del tumor [88]. Una de las principales causas de recurrencia en el GBM es su alto grado de infiltración en el tejido cortical [7]. La generación de la cicatriz glial tras el tratamiento con CPT-5ALA podría disminuir la infiltración del glioblastoma e incrementar el éxito de su resección quirúrgica. Esto ayudaría a aumentar el tiempo de supervivencia libre de recurrencia y, en consecuencia, la esperanza de vida de los pacientes. Como se muestra en la **Figura 27**, en uno de los animales tratados con el profármaco el GBM injertado en el animal derivó a un glioblastoma quístico. Los casos clínicos reportan que esta clase de glioblastoma suele presentar una mayor esperanza de vida que el GBM y un menor riesgo de recurrencia al tener límites no difusos [102]. El análisis histológico de esta muestra parece indicar que formación del quiste se ha llevado a cabo mediada por fibroblastos, sin embargo, no se han realizado pruebas de marcaje específico de este tipo celular. Por lo que sería recomendable realizar pruebas para determinar qué tipo celular ha formado el quiste.

En resumen, los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* e *in vivo* llevados a cabo nos permiten confirmar que el profármaco CPT-5ALA presenta capacidad para traspasar la BHE y llegar a las células tumorales de GBM. Por tanto, las moléculas de CPT y de 5ALA no pierden su capacidad de traspasar la Barrera hematoencefálica [69], [77] tras su unión para formar el profármaco CPT-5ALA. Actualmente, el tratamiento del GBM supone un gran reto debido a la dificultad existente a la hora de diseñar fármacos capaces de traspasar la barrera hematoencefálica y con eficacia terapéutica para esta enfermedad. Por ello consideramos que el uso clínico de este profármaco puede llegar a tener un gran potencial. También concluimos que podría presentar actividad anticancerígena, ya que inhibe la proliferación de las células de GBM, retrasando su crecimiento y evolución. Cabe destacar también que el  $IC_{50}$  de la CPT-5ALA es 1,75 veces mayor que el  $IC_{50}$  de la CPT y que la histología del cerebro no ha revelado una

disminución de la proliferación celular ni un aumento de la apoptosis en células típicamente proliferativas del cerebro, como son las células del plexo coroideo. De lo cual podemos deducir que el profármaco no ha tenido efectos adversos en el tejido cerebral, al igual que no ha tenido en el resto del organismo.

Por estas razones consideramos que la modificación que aquí presentamos sobre la CPT disminuye la toxicidad descrita en esta molécula. A parte de las ventajas del profármaco descritas del profármaco en este trabajo, en el apartado de *Introducción* se comentaba que el efecto de la TMZ estaba comenzando a ser cuestionada en los últimos años. Se está comenzando a pensar que favorece la aparición de mutaciones en las células de GBM, aumentando su agresividad tras el tratamiento y en la recurrencia [46]. Consideramos que el profármaco de CPT-5ALA supone una mejora frente a la TMZ. A diferencia de la TMZ, el agente quimioterapéutico propuesto en este trabajo no es mutágeno. Por lo que la recurrencia de GBM aparecida tras un tratamiento con CPT será menos agresiva que la aparecida tras el tratamiento con TMZ, que poseerá un fenotipo hipermutado.

A modo de proyecciones futuras, sería interesante estudiar un aumento de dosis para los ensayos *in vivo*. La dosis empleada en este trabajo se estableció en base a estudios de administración realizados con CPT, la cual ahora sabemos que es más tóxica que CPT-5ALA. La adición de la molécula de 5ALA aumenta la selectividad del profármaco dirigiéndolo a las células tumorales de glioblastoma. Reduciendo los efectos secundarios que posee la CPT libre. Como nuevo enfoque terapéutico, también proponemos analizar el efecto del profármaco CPT-5ALA en combinación con los fármacos con los que se administra normalmente el Iri en el tratamiento del GBM, como son la TMZ y BVZ. Con el fin de determinar si la sustitución de Iri por el nuevo profármaco descrito en este trabajo supone una mejora respecto a los tratamientos administrados actualmente. El CPT-5ALA posee menor toxicidad y mayor especificidad por las células de GBM que Iri. Lo que permitiría aumentar las dosis de CPT administradas y, así, la eficiencia del tratamiento. Generalmente, las terapias que atacan únicamente a un tipo de diana obtienen un porcentaje de respuesta de aproximadamente 10% o 15% [92]. Debido a la existencia de rutas paralelas o compensatorias de función que evadan la acción de la terapia, haciendo a la célula resistente a dicho fármaco. Por esta razón, actualmente se apuesta por terapias combinadas, que permitan atacar a la célula cancerígena en diferentes dianas [15].

Finalmente, a modo de proyección futura, también planteamos caracterizar la actividad fotodinámica del profármaco y su posible aplicación en fototerapia dinámica. En el apartado de *Introducción* se comentó que el uso de PpIX para FTD, y en consecuencia de 5ALA, está teniendo



mucho auge en el tratamiento de ciertos tipos de tumores. Por ello, en este trabajo también proponemos utilizar la molécula de 5ALA del profármaco para FTD y estudiar si existe algún comportamiento sinérgico entre la actividad anticancerígena de CPT y la FTD. La FTD provoca la liberación de iniciadores de apoptosis que, junto con la desestabilización del DNA, pueden reducir la resistencia a terapia o la capacidad de evasión de la apoptosis en las células de GBM [80]. Esto podría aumentar la actividad anticancerígena del profármaco.

En la actualidad el principal reto es retrasar o frenar la aparición de recurrencia del GBM, que es la principal causa de muerte en los pacientes. En este sentido, no solo es interesante estudiar si existe un aumento en la supervivencia. También es muy importante analizar si hay cambios en los tiempos de supervivencia libre de progresión. Finalmente, también consideramos que se podría investigar el uso del prodrug CPT-5ALA para el tratamiento de otros tumores con sobreactivación de la ruta de biosíntesis de protoporfirinas, como los gliomas de menor grado que el GBM [103].

En resumen, en este trabajo presentamos un nuevo agente de contraste dual para mejorar el diagnóstico de GBM por MRI y un nuevo profármaco de CPT para mejorar su tratamiento. Los resultados obtenidos indican que el AC mejora el contraste de la imagen en las secuencias T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> sin afectar al organismo. Esta herramienta aumentará la información aportada por la MRI. Lo que supone un avance que permitirá, por un lado, realizar diagnósticos más precisos y detallados del GBM, y por otro lado evitar falsos diagnósticos. Mientras que la caracterización del profármaco CPT-5ALA parece confirmar el carácter anticancerígeno de la molécula y su especificidad por las células tumorales. Ambos compuestos han demostrado que presentan buena actividad en su respectiva función y que poseen un buen perfil de bioseguridad. El diagnóstico en fase temprana del GBM en combinación con un tratamiento efectivo y selectivo, favorecido por los compuestos aquí propuestos, podría suponer una mejora notable en la esperanza de vida de los afectados por GBM o en el tiempo libre de recurrencia. Por esta razón, los resultados obtenidos en este trabajo pueden llegar a tener una gran importancia clínica en el futuro y dar lugar a nuevos protocolos terapéuticos para el tratamiento del GBM.





# Conclusiones



## 6. CONCLUSIONES

1. El empaquetamiento y la disposición de los átomos de Gd y Fe en la nanopartícula  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  permite la visualización del agente de contraste en las secuencias  $T_1$  y  $T_2$  y evita el apantallamiento entre ambas secuencias.
2. El  $\text{IC}_{50}$  del agente de contraste no ha sido hallado entre el margen de concentraciones utilizado en el experimento. La baja tasa de citotoxicidad comprobada en los modelos *in vitro* y la ausencia de daño histológico en los tejidos de los animales tratados con el AC indican que la molécula presenta un perfil de bioseguridad alto, recalcando el potencial clínico de este AC.
3. La recubierta de PEG de la molécula  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  reduce la toxicidad de la molécula tras su administración *in vitro*, aumentando su estabilidad en el medio fisiológico y el tiempo de aclaramiento en el organismo. Permitiendo el correcto marcaje y favoreciendo el contraste de todos los órganos.
4. Los ensayos de toxicidad en las líneas de glioblastoma y en las células del sistema nervioso central, así como los ensayos de funcionalidad neuronal, indican que la modificación de la molécula de CPT mediante la unión con la molécula 5ALA disminuye la toxicidad en células sanas y aumenta la especificidad por las células tumorales respecto el compuesto original.
5. La molécula de CPT del profármaco CPT-5ALA interrumpe la síntesis de DNA durante el proceso de Replicación en la Fase S del ciclo celular. Produciendo un arresto del ciclo celular en la fase no proliferativa de las células tumorales de glioblastoma. Esto provoca el inicio de la vía de apoptosis en las células de glioblastoma, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, en modelos animales de glioblastoma intracraneal.
6. La administración sistémica intravenosa del profármaco CPT-5ALA no presenta riesgos para el organismo y no ocasiona daños histológicos ni morfológicos en riñón, bazo y corazón. El profármaco parece demostrar mayor especificidad por las células de glioblastoma que la CPT ya que los animales tratados no han presentado algunos de los efectos secundarios más característicos de los derivados comerciales de CPT, como la alopecia. No obstante, el profármaco conserva otros efectos colaterales comunes de los derivados de CPT como es el daño pulmonar.
7. La molécula de CPT-5ALA retrasa el crecimiento del glioblastoma multiforme en el modelo *in vivo* intracraneal basado en células de la línea de C6. Su administración intravenosa tras dos semanas de tratamiento consigue reducir el tamaño y la proliferación del tumor. A la vez que aumenta el porcentaje de células de glioblastoma

## 6. Conclusiones

en apoptosis. Indicando que el profármaco presenta permeabilidad en la barrera hematoencefálica que le permite llegar al tumor.

8. La actividad demostrada por el profármaco CPT-5ALA y su baja toxicidad en el resto del organismo lo sitúan como un posible nuevo tratamiento para el glioblastoma multiforme.





# **Bibliografía**





- [1] M. Greaves and C. Maley, "Clonal evolution in cancer," *Nature*, vol. 481, no. 7381, pp. 306–313, 2012.
- [2] Rio-Hortega, "Estructura y sistematización de los gliomas e paragliomas," *Arch. Esp. Onc*, vol. 2, p. 411, 1932.
- [3] S. Ramon Y Cajal Agüeras, "Pío del Río-Hortega: A Pioneer in the Pathology of Central Nervous System Tumors," *Front. Neuroanat.*, vol. 10, p. 13, Mar. 2016.
- [4] E. G. U. Fuentes, F. N. Expósito, R. M. Villaverde, and M. Á. M. Soto, "Tumores del sistema nervioso central," *Medicine (Baltimore)*, vol. 10, no. 25, pp. 1672–1686, 2009.
- [5] J. C. Buckner, P. D. Brown, B. P. O'Neill, F. B. Meyer, C. J. Wetmore, and J. H. Uhm, "Central nervous system tumors," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 82, no. October, pp. 1271–1286, 2007.
- [6] D. N. Louis *et al.*, "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary," *Acta Neuropathol.*, vol. 131, no. 6, pp. 803–820, 2016.
- [7] A. J. Ironside and J. W. Ironside, "Pathology of tumours of the central nervous system," *Surgery*, vol. 30, no. 3, pp. 107–115, 2012.
- [8] D. N. Louis *et al.*, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system," *Acta Neuropathol.*, vol. 114, pp. 97–109, 2007.
- [9] L. M. De Angelis and I. K. Mellinghoff, "Virchow 2011 or how to ID(H) human glioblastoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 34, pp. 4473–4474, 2011.
- [10] "A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. By Percival Bailey and Harvey Cushing. Medium 8vo. Pp. 175, with 108 illustrations. 1926. Philadelphia, London, and Montreal: J. B. Lippincott," *BJS*, vol. 14, no. 55, pp. 554–555, 1927.
- [11] O. T. Bailey, "Genesis of the Percival Bailey-Cushing classification of gliomas," *Pediatr. Neurosci.*, vol. 12, no. 4–5, pp. 261–265.
- [12] C. Hardwidge and S. Hettige, "Tumours of the central nervous system," *Surg. - Oxford Int. Ed.*, vol. 30, no. 3, pp. 155–161, Apr. 2018.
- [13] M. Preusser *et al.*, "Current concepts and management of glioblastoma," *Ann. Neurol.*, vol. 70, pp. 9–21, 2011.
- [14] A. Fatooh *et al.*, "Understanding the role of tumor stem cells in glioblastoma multiforme: A review article," *J. Neurooncol.*, vol. 103, pp. 397–408, 2011.
- [15] F. B. Furnari *et al.*, "Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment," *Genes Dev.*, vol. 21, pp. 2683–2710, 2007.
- [16] A. Omuro and L. M. DeAngelis, "Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 310, pp. 1842–1850, 2013.
- [17] W. G. Bradley, V. Waluch, R. a Yadley, and R. R. Wyckoff, "Comparison of CT and MR in 400 patients with suspected disease of the brain and cervical spinal cord," *Radiology*, vol. 152, pp. 695–702, 1984.
- [18] R. B. Lauffer, "Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design," *Chem. Rev.*, vol. 87, no. 5, pp. 901–927, Oct. 1987.
- [19] N. Lee, D. Yoo, D. Ling, M. H. Cho, T. Hyeon, and J. Cheon, "Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 19, pp. 10637–10689, Oct. 2015.
- [20] A. Cabrera-García *et al.*, "Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T1-T2 Dual Magnetic Resonance Imaging," *Nanoscale*, 2018.
- [21] A. Z. Khawaja, D. B. Cassidy, J. Al Shakarchi, D. G. McGrogan, N. G. Inston, and R. G. Jones, "Revisiting the risks of MRI with Gadolinium based contrast agents-review of literature and guidelines," *Insights Imaging*, vol. 6, pp. 553–558, 2015.
- [22] J. Choi, J.-H. Lee, T.-H. Shin, H.-T. Song, E. Y. Kim, and J. Cheon, "Self-Confirming 'AND' Logic Nanoparticles for Fault-Free MRI," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 32, pp. 11015–11017, Aug. 2010.

- [23] D. Ricard, A. Idbaih, F. Ducray, M. Lahutte, K. Hoang-Xuan, and J. Y. Delattre, "Primary brain tumours in adults," *Lancet*, vol. 379, no. 9830, pp. 1984–1996, 2012.
- [24] A. Barlow and J. W. Ironside, "Pathology of tumours of the central nervous system," *Surg. - Oxford Int. Ed.*, vol. 27, no. 3, pp. 99–106, Apr. 2018.
- [25] K. Ng, R. Kim, S. Kesari, B. Carter, and C. C. Chen, "Genomic profiling of glioblastoma: Convergence of fundamental biologic tenets and novel insights," *J. Neurooncol.*, vol. 107, pp. 1–12, 2012.
- [26] S. Kesari, "Understanding glioblastoma tumor biology: The potential to improve current diagnosis and treatments," *Semin. Oncol.*, vol. 38, no. 6, pp. S2–S10, 2011.
- [27] A. K. Sharma and R. König, "Metabolic network modeling approaches for investigating the 'hungry cancer,'" *Semin. Cancer Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 227–234, 2013.
- [28] M. Jansen, S. Yip, and D. Louis, "Molecular pathology in adult neuro-oncology: an update on diagnostic, prognostic and predictive markers," *Lancet*, vol. 9, no. 7, pp. 717–726, 2010.
- [29] Z. An, O. Aksoy, T. Zheng, Q.-W. Fan, and W. a. Weiss, "Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies," *Oncogene*, 2018.
- [30] F. E. Bleeker, R. J. Molenaar, and S. Leenstra, "Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma," *J. Neurooncol.*, vol. 108, pp. 11–27, 2012.
- [31] M. Jackson, F. Hassiotou, and A. Nowak, "Glioblastoma stem-like cells: At the root of tumor recurrence and a therapeutic target," *Carcinogenesis*, vol. 36, no. 2, pp. 177–185, 2014.
- [32] T. N. Ignatova, V. G. Kukekov, E. D. Laywell, O. N. Suslov, F. D. Vrionis, and D. a. Steindler, "Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro," *Glia*, vol. 39, no. April, pp. 193–206, 2002.
- [33] A. Bradshaw, A. Wickremsekera, S. T. Tan, L. Peng, P. F. Davis, and T. Itinteang, "Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme," *Front. Surg.*, vol. 3, no. April, pp. 1–15, 2016.
- [34] H. Carén, S. M. Pollard, and S. Beck, "The good, the bad and the ugly: Epigenetic mechanisms in glioblastoma," *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, pp. 849–862, 2013.
- [35] M. Maleszewska and B. Kaminska, "Is glioblastoma an epigenetic malignancy?," *Cancers (Basel)*, vol. 5, pp. 1120–1139, 2013.
- [36] R. Martinez and M. Esteller, "The DNA methylome of glioblastoma multiforme," *Neurobiol. Dis.*, vol. 39, no. 1, pp. 40–46, 2010.
- [37] P. Chinnaiyan *et al.*, "The metabolomic signature of malignant glioma reflects accelerated anabolic metabolism," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 6, pp. 5878–5888, 2012.
- [38] S. Venneti and C. B. Thompson, "Metabolic Modulation of Epigenetics in Gliomas," *Brain Pathol.*, vol. 23, no. 38, pp. 217–221, 2013.
- [39] A. S. Krall and H. R. Christofk, "A metabolic metamorphosis," *Nature*, vol. 496, p. 38, Apr. 2013.
- [40] H. A. Leroy, M. Vermandel, J. P. Lejeune, S. Mordon, and N. Reyns, "Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review," *Lasers Surg. Med.*, vol. 47, no. May, pp. 441–451, 2015.
- [41] R. Stupp *et al.*, "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 10, pp. 987–996, 2005.
- [42] H. C. Bock *et al.*, "First-line treatment of malignant glioma with carmustine implants followed by concomitant radiochemotherapy: A multicenter experience," *Neurosurg. Rev.*, vol. 33, pp. 441–449, 2010.
- [43] M. Sabel and A. Giese, "Safety profile of carmustine wafers in malignant glioma: a review of controlled trials and a decade of clinical experience," *Curr. Med. Res. Opin.*, vol. 24, no. 11, pp. 3239–3257, Nov. 2008.
- [44] A. M. Davies, U. Weinberg, and Y. Palti, "Tumor treating fields: A new frontier in cancer therapy," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1291, pp. 86–95, 2013.
- [45] G. Perazzoli *et al.*, "Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: Implication of MGMT, MMR, P-glycoprotein and CD133 expression," *PLoS One*, vol. 10, pp. 1–23, 2015.
- [46] J. Wang *et al.*, "Clonal evolution of glioblastoma under therapy," *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 7, pp. 768–776, 2016.

- [47] S. Yip *et al.*, "MSH6 Mutations Arise in Glioblastomas during Temozolomide Therapy and Mediate Temozolomide Resistance," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 14, p. 4622 LP-4629, Jul. 2009.
- [48] S. Agnihotri *et al.*, "Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 61, no. 1, pp. 25–41, Feb. 2013.
- [49] K. F. Hofland *et al.*, "Neoadjuvant bevacizumab and irinotecan versus bevacizumab and temozolomide followed by concomitant chemoradiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme: A randomized phase II study," *Acta Oncol. (Madr.)*, vol. 53, pp. 939–944, 2014.
- [50] W. Wick, M. Weller, M. van den Bent, and R. Stupp, "Bevacizumab and Recurrent Malignant Gliomas: A European Perspective," *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 12, pp. e188–e189, 2010.
- [51] A.-M. Bleau *et al.*, "PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 226–235, 2009.
- [52] C. Zahonero *et al.*, "Preclinical Test of Dacomitinib, an Irreversible EGFR Inhibitor, Confirms Its Effectiveness for Glioblastoma," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 14, no. July, pp. 1548–1558, 2015.
- [53] J. M. Sepúlveda-Sánchez *et al.*, "Phase II trial of dacomitinib, a pan-HER (human epidermal growth factor receptor) tyrosine kinase inhibitor, in recurrent glioblastoma patients with EGFR amplification.," *Neuro. Oncol.*, vol. 227, pp. 25–31, 2017.
- [54] J. H. Uhm *et al.*, "Phase II Evaluation of Gefitinib in Patients With Newly Diagnosed Grade 4 Astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 80, no. 2, pp. 347–353, 2011.
- [55] L. Benayoun *et al.*, "Porfimer-sodium (Photofrin-II) in combination with ionizing radiation inhibits tumor-initiating cell proliferation and improves glioblastoma treatment efficacy," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 14, no. 1, pp. 64–74, 2013.
- [56] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson, "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. January, pp. 41–53, 2006.
- [57] M. M. Patel and B. M. Patel, "Crossing the Blood–Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain," *CNS Drugs*, vol. 31, no. 2, pp. 109–133, Feb. 2017.
- [58] Y. A. Komarova, K. Kruse, D. Mehta, and A. B. Malik, "Protein interactions at endothelial junctions and signaling mechanisms regulating endothelial permeability," *Circulation research*, vol. 120, no. 1. pp. 179–206, Jan-2017.
- [59] R. K. Oberoi, K. E. Parrish, T. T. Sio, R. K. Mittapalli, W. F. Elmquist, and J. N. Sarkaria, "Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood-brain barrier to treat glioblastoma," *Neuro. Oncol.*, vol. 18, no. July 2014, pp. 27–36, 2016.
- [60] Z. Zhou *et al.*, "A Synergistically Enhanced T(1)–T(2) Dual-Modal Contrast Agent," *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, vol. 24, no. 46. pp. 6223–6228, Dec-2012.
- [61] L. Yang *et al.*, "Europium-engineered iron oxide nanocubes with high T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> contrast abilities for MRI in living subjects," *Nanoscale*, vol. 7, pp. 6843–6850, 2015.
- [62] J. F. Pizzolato and L. B. Saltz, "The camptothecins," *Lancet*, vol. 361, pp. 2235–2242, 2003.
- [63] V. J. Venditto and E. E. Simanek, "Cancer Therapies Utilizing the Camptothecins: A Review of the in Vivo Literature," *Mol. Pharm.*, vol. 7, no. 2, pp. 307–349, Apr. 2010.
- [64] J. Murai, "Targeting DNA repair and replication stress in the treatment of ovarian cancer," *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 4, pp. 619–628, 2017.
- [65] S. N. Waqar and D. Morgensztern, "Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC)," *Pharmacol. Ther.*, vol. 180, pp. 16–23, 2017.
- [66] H. Bleiberg, "CPT-11 in gastrointestinal cancer," *Eur. J. Cancer*, vol. 35, no. 3, pp. 371–379, 1999.
- [67] S. Cao and Y. M. Rustum, "Synergistic Antitumor Activity of Irinotecan in Combination with 5-Fluorouracil in Rats Bearing Advanced Colorectal Cancer : Role of Drug Sequence and Dose Advances in Brief Synergistic Antitumor Activity of Irinotecan in Combination with 5-Fluorouracil i," vol. 11, no. sequence I, pp. 3717–3721, 2000.
- [68] M. H. Jagasia *et al.*, "Weekly irinotecan and cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a

- multicenter phase II study.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. January, pp. 68–73, 2001.
- [69] S. M. Blaney *et al.*, "Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 9-aminocamptothecin (9-AC), irinotecan (CPT-11), and SN-38 in nonhuman primates," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 41, no. 6, pp. 464–468, Mar. 1998.
- [70] J. N. Jakobsen, B. Hasselbalch, M.-T. Stockhausen, U. Lassen, and H. S. Poulsen, "Irinotecan and bevacizumab in recurrent glioblastoma multiforme," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 12, pp. 825–833, 2011.
- [71] U. Herrlinger *et al.*, "Bevacizumab Plus irinotecan versus temozolomide in newly diagnosed O6-methylguanine-DNA methyltransferase nonmethylated glioblastoma: The randomized GLARIUS trial," *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. 14, pp. 1611–1619, 2016.
- [72] P. Botella *et al.*, "Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation," *J. Control. Release*, vol. 156, no. 2, pp. 246–257, 2011.
- [73] G. Yang, C. Sau, W. Lai, J. Cichon, and W. Li, "Perspectives on Biologically Active Camptothecin Derivatives," vol. 35, no. 4, pp. 753–789, 2015.
- [74] H. L. Bonkovsky, J. T. Guo, W. Hou, T. Li, T. Narang, and M. Thapar, "Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias," *Compr. Physiol.*, vol. 3, no. January, pp. 365–401, 2013.
- [75] A. Johansson, G. Palte, O. Schnell, J. C. Tonn, J. Herms, and H. Stepp, "5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors," *Photochem. Photobiol.*, vol. 86, no. 21, pp. 1373–1378, 2010.
- [76] G. C. Ferreira, R. Franco, S. G. Lloyd, I. Moura, J. J. Moura, and B. H. Huynh, "Structure and function of ferrochelatase," *J Bioenerg Biomembr*, vol. 27, no. 2, pp. 221–229, 1995.
- [77] S. R. Ennis *et al.*, "Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain," *Brain Res.*, vol. 959, no. 2, pp. 226–234, 2003.
- [78] J. C. Kennedy and R. H. Pottier, "New trends in photobiology: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 275–292, 1992.
- [79] T. J. Beck *et al.*, "Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX," *Lasers Surg. Med.*, vol. 39, no. February, pp. 386–393, 2007.
- [80] H. Inoue *et al.*, "Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy," *J. Neurooncol.*, vol. 83, pp. 223–231, 2007.
- [81] A. M. Clements, C. Muniesa, C. C. Landry, and P. Botella, "Effect of surface properties in protein corona development on mesoporous silica nanoparticles," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 55, pp. 29134–29138, 2014.
- [82] I. Villate-Beitia *et al.*, "Non-viral vectors based on magnetoplexes, lipoplexes and polyplexes for VEGF gene delivery into central nervous system cells," *Int. J. Pharm.*, vol. 521, no. 1–2, pp. 130–140, 2017.
- [83] A. Stett *et al.*, "Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 377, pp. 486–495, 2003.
- [84] M. Schürmann *et al.*, "Technical feasibility study for production of tailored multielectrode arrays and patterning of arranged neuronal networks," *PLoS One*, vol. 13, pp. 1–20, 2018.
- [85] V. L. Jacobs, P. a. Valdes, W. F. Hickey, and J. a. De Leo, "Current Review of *in Vivo* GBM Rodent Models: Emphasis on the CNS-1 Tumour Model," *ASN Neuro*, vol. 3, no. 3, p. AN20110014, 2011.
- [86] D. B. Morton and P. H. Griffiths, "Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment," *Vet. Rec.*, vol. 116, no. 16, pp. 431–436, 1985.
- [87] D. J. Langford *et al.*, "Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse," *Nat. Methods*, vol. 7, no. May, pp. 447–449, 2010.
- [88] J. W. Fawcett and R. . Asher, "The glial scar and central nervous system repair," *Brain Res. Bull.*,

- vol. 49, no. 6, pp. 377–391, 1999.
- [89] K. F. Schmidt *et al.*, “Volume reconstruction techniques improve the correlation between histological and in vivo tumor volume measurements in mouse models of human gliomas,” *J. Neurooncol.*, vol. 68, pp. 207–215, 2004.
- [90] T. L. Riss, A. L. Niles, and L. Minor, “Cell Viability Assays Assay Guidance Manual,” *Assay Guid. Man.*, pp. 1–23, 2004.
- [91] G. J. Brewer, M. D. Boehler, A. N. Ide, and B. C. Wheeler, “Chronic electrical stimulation of cultured hippocampal networks increases spontaneous spike rates,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 184, pp. 104–109, 2009.
- [92] P. Y. Wen and S. Kesari, “Malignant gliomas in adults,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, pp. 492–507, 2008.
- [93] L. F. Liu, P. Duann, C. T. Lin, P. D’Arpa, and J. Wu, “Mechanism of action of camptothecin,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 803, pp. 44–49, 1996.
- [94] J. Lu, M. Liong, Z. Li, J. I. Zink, and F. Tamanoi, “Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals,” *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 6, no. 16, pp. 1794–1805, Aug-2010.
- [95] F. M. de Man, A. K. L. Goey, R. H. N. van Schaik, R. H. J. Mathijssen, and S. Bins, “Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics,” *Clin. Pharmacokinet.*, pp. 1–26, 2018.
- [96] P. Krishnan *et al.*, “Efficiency of newly formulated camptothecin with  $\beta$ -cyclodextrin-EDTA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>nanoparticle-conjugated nanocarriers as an anti-colon cancer (HT29) drug,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. July, pp. 1–16, 2017.
- [97] J. M. Ayuso *et al.*, “Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. October, pp. 1–16, 2016.
- [98] G. J. Creemers *et al.*, “Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer: results of a large European phase II study,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 14, no. 12, pp. 3056–3061, 1996.
- [99] P. Botella and E. Rivero-Buceta, “Safe approaches for camptothecin delivery: Structural analogues and nanomedicines,” *J. Control. Release*, vol. 247, pp. 28–54, 2017.
- [100] C. M. Offersen and J. Skjoeth-Rasmussen, “Evaluation of the risk of liver damage from the use of 5-aminolevulinic acid for intra-operative identification and resection in patients with malignant gliomas,” *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 159, pp. 145–150, 2017.
- [101] J. Weekes, A. K. Y. Lam, S. Sebesan, and Y. H. Ho, “Irinotecan therapy and molecular targets in colorectal cancer: A systemic review,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 15, pp. 3597–3602, 2009.
- [102] S. Utsuki *et al.*, “Pathological and clinical features of cystic and noncystic glioblastomas,” *Brain Tumor Pathol.*, vol. 23, pp. 29–34, 2006.
- [103] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, and H. J. Reulen, “Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 7, no. May, pp. 392–401, 2006.





# Anexo I:





**Artículo:** Engineered Contrast Agents in a Single Structure for T1-T2 Dual Magnetic Resonance Imaging. *Nanoscale* (2017)- DOI 10.1039/C7NR07948F

## Engineered Contrast Agents in a Single Structure for $T_1$ - $T_2$ Dual Magnetic Resonance Imaging†

Alejandro Cabrera-García,<sup>a</sup> Elisa Checa-Chavarría,<sup>b</sup> Jesús Pacheco-Torres,<sup>c</sup> Angela Bernabeu-Sanz,<sup>d</sup> Alejandro Vidal-Moya,<sup>a</sup> Eva Rivero-Buceta,<sup>a</sup> German Sastre,<sup>a</sup> Eduardo Fernandez,<sup>b</sup> and Pablo Botella<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Tecnología Química, Universitat Politècnica de València-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain*

<sup>b</sup>*Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain and Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER-BBN), Spain*

<sup>c</sup>*Unidad de Resonancia Magnética Funcional, Instituto de Neurociencias (CSIC-UMH), Alicante, Spain*

<sup>d</sup>*Unidad de Resonancia Magnética, Inscanner S.L., Alicante, Spain*

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: pbotella@itq.upv.es. Fax: +34 96 3879444.

†*Electronic Supporting Information (ESI) available: Additional tables and figures on material characterization and relaxivity values.*

### Abstract

The development of contrast agents (CAs) for Magnetic Resonance Imaging (MRI) with  $T_1$ - $T_2$  dual-mode relaxivity requires the accurate assembly of  $T_1$  and  $T_2$  magnetic centers in a single structure. In this context, we have synthesized a novel hybrid material by monitoring the formation of Prussian Blue analogue  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  nanoparticles with tailored shape (from nanocrosses to nanorods) and size, and further protection with a thin and homogeneous silica coating through hydrolysis and polymerization of silicate at neutral pH. The resulting  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  magnetic nanoparticles are very stable in biological fluids. Interestingly, this combination of Gd and Fe magnetic centers closely packed in the crystalline network promotes a magnetic synergistic effect, which results in significant improvement of longitudinal relaxivity with regards to soluble  $\text{Gd}^{3+}$  chelates, whilst keeping the high transversal relaxivity inherent to the iron component. As a consequence, this material shows excellent activity as MRI CA, improving positive and negative contrast in  $T_1$ - and  $T_2$ - weighted MR images, both in *in vitro* (e.g., phantom) and *in vivo* (e.g., Sprague-Dawley rats) models. In addition, this hybrid shows a high biosafety profile and has strong ability to incorporate organic molecules on surface with variable functionality, displaying great potential for further clinical application.

**Keywords:** Core-Shell Hybrid, Magnetic Nanoparticles, Prussian Blue Analogue, Silica Coating, Dual Magnetic Resonance Imaging, Contrast Agent.

## Introduction

Magnetic resonance imaging (MRI) is a powerful and thoroughly used non-invasive and non-radioactive technique for clinical diagnostic that can provide information on the anatomy, function and metabolism of tissues *in vivo* [1-5]. In 1H-MRI, Signal Intensity (SI) depends on a combination of factors including proton density, longitudinal ( $T_1$ ) and transversal ( $T_2$ ) relaxivity times and the microenvironment (cell density, pH, oxygenation). Unfortunately, the intrinsic contrast provided by these factors and associated changes due to a pathologic condition are often too limited to enable a sensitive and accurate diagnosis.

For that reason, there is an increased use of MRI contrast agents (CA) that improve image resolution based on their selective accumulation in the Region Of Interest (ROI) [6]. Based on their relaxation activity, these CAs are classified as positive ( $T_1$ -weighted) or negative ( $T_2$ -weighted) image contrast promoters. All clinically approved MRI  $T_1$  CAs are based on paramagnetic  $Gd^{3+}$  soluble chelates with polyamino-polycarboxylate ligands [7,8], due to their strong paramagnetic activity. However, the use of  $Gd^{3+}$  solutions involves some technical issues and health risks that limit imaging performance. Here, the quick renal filtration indicates a poor pharmacokinetic profile, reducing sensitivity, increasing scanning time, and imposing the administration of high  $Gd^{3+}$  doses [9], which may lead to toxicity effects, such as headache, nausea, dizziness and nephrogenic systemic fibrosis [10- 12]. On the other hand, current  $T_2$  CAs in clinical practice are based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) [13], which produce  $T_2$  shortening, providing negative contrast. However, this is hardly seen in low signal body regions, and it may be confused with hemorrhages, calcification, fat, blood clots and other possible artifacts in damaged tissue, which lowers their interest in clinical diagnosis.

At this point, the acquisition of MRI weighted in  $T_1$  and  $T_2$  could improve the safety of diagnosis and cross-validate the possible false-positive information [14].  $T_1$ - $T_2$  dual-modal strategy can provide complementary  $T_1$  and  $T_2$  MRI images, making it possible to isolate artifact signals from the contrast agents in the ROI [15]. An ideal  $T_1$ - $T_2$  dual-modal MRI acquisition is desirable for tissues with moderate  $T_1$  and  $T_2$  relaxation times, such as liver, kidneys, muscle and brain matter [12]. Actually, some nanoparticles present unique characteristics that allow exploiting the  $T_1$ - $T_2$  dual-mode CA concept. Several strategies have been proposed for the development of these materials. The simplest way is the direct conjugation of  $T_1$  elements (e.g., Gd or Mn-containing systems) and  $T_2$  elements (e.g., SPIONs). For instance, Gd-chelates can be covalently coupled over the surface of SPIONs [16], although this usually results in low gadolinium loading; not to mention the fact that metal leaching in physiological fluids may be an issue. Alternatively, a hybrid system of  $T_1$  and  $T_2$  elements can be prepared by assembling gadolinium oxide and iron

nanoparticles in a core-shell layout structure [17]. Unfortunately, interferences are usual, as magnetic coupling induced by close T2/T1 structures trends to undesirable quenching of both T2 and T1 signals in MRI [18]. In these cases, a silica separating layer inserted between the T2 magnetic nanoparticle (core) and the T1 contrast material (shell) allows for a fine separation distance control, which can minimize the perturbation of T2 signal over the T1 contrast effect [19]. However, although the SiO<sub>2</sub> layer between the T2 core and T1 shell may attenuate magnetic coupling, it also reduces the magnetic field to surrounding water molecules, leading to strong T2 signal reduction [20]. Conversely, it is possible to minimize T1 and T2 signal coupling by monitoring the incorporation of Gd<sup>3+</sup> into iron nanoparticles. Here, composites obtained by embedding gadolinium oxide crystals into iron nanoparticles, [21] or by synthesis of “Janus” nanoparticles with both components [20], have shown improved magnetic properties, with a synergistic action between T1 and T2 centers that enhance contrast effects in MR imaging. Moreover, a similar cooperative effect has been reported by doping SPIONs with Mn<sup>2+</sup> ions [22]. In this context, it has been reported that Prussian Blue (PB) analogues doped with Gd<sup>3+</sup>, with general molecular formula K<sub>x</sub>Gd<sub>1-x</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] and nanosized crystallites, may present high performance as dual T1-T2 contrast agents [23,24]. In these materials, T1 and T2 magnetic centers are located in the same crystalline framework, very close to each other. Also, Mn-doped PB has been proposed as CA with ultrahigh longitudinal relaxivity [25]. The local magnetic field induced by the superparamagnetic Fe centers promotes Gd spins alignment in the same direction, resulting in a boost of T1 contrast effect [21,26] which, gathered with the strong T2 contrast activity associated to Fe atoms, may promote a mastered combination of magnetic centers in the same network for dual-modal MRI. Unfortunately, and despite the good relaxivity results obtained in *in vitro* studies, the clinical use of PB derivatives as MRI CAs is precluded by their partial solubility in aqueous medium at physiological pH, releasing toxic quantities of both Gd and Fe ions. This situation, nevertheless, could be skipped if Gd-containing PB nanoparticles are protected with a stable and diamagnetic thin silica coating. This is not possible in alkaline medium, as PB and its analogs react with soluble silicate, triggering an ion exchange process which results in complete iron exchange and stoichiometric condensation of gadolinium hydroxide and silica, to give Gd(OH)<sub>3</sub>·3SiO<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O composite [27,28]. Herein, we have successfully carried out the coating of PB derivative Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] nanoparticles by polymerizing the silicate at neutral pH. For this purpose, we have optimized a biomimetic synthetic strategy developed by our group to activate silica at pH~7 by using functional mimics of the protein silicatein α (e.g., triethylamine, TEA) [29] as catalyst. By stepwise control of Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] preparation and subsequent silane hydrolysis and polymerization, we have obtained hybrid material Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub> nanoparticles, very stable in biological

fluids, with tailored shape (from nanocrosses to nanorods) and size. By combining Gd and Fe magnetic centers closely packed in the same crystalline structure a magnetic synergistic effect is imposed by Fe atoms over Gd sites, which leads to strong increase of longitudinal relaxivity, whilst keeping the high transversal relaxivity corresponding to Fe centers. This results in a CA with constant Gd:Fe atomic ratio able to improve positive and negative contrast in T1- and T2-weighted MR images, both in *in vitro* (e.g., phantom) and *in vivo* (e.g., Sprague-Dawley rats) systems. Furthermore, this material shows low cytotoxicity in cell culture studies and no structural or cellular abnormalities in histological sections, and the silica coating is easy to functionalize with organic groups, displaying great potential for clinical MRI.

## Experimental

### Reagents, cells and animals

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, except for Gd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, (3-cyanopropyl) trimethoxysilane (CPTMS) (ABCR), tetramethyl orthosilicate (TMOS) (MERCK), 2,5,8,11-Tetraoxatetradecan-14-oic acid succinimidyl ester (PEG3) (Iris Biotech) and HPLC grade solvents (Scharlab).

HeLa cell line, 3T3 (fibroblasts cells), 42-MG-BA (glioblastoma multiforme cells) and SH-SY5Y (neuroblastoma cells), were purchased from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. Reagents used for cells growth were MEM (Earle's), RPMI Medium 1640, DMEM and Ham (F12) Nut MIX (Gibco BRL-Life Technologies, CA, USA) fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin solution (Pen-Strep). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Male Sprague-Dawley rats (250–300 g) (3 specimens) were acquired from Janvier Labs (France) and maintained under a 12/12 h light/dark cycle (lights on 07:00–19:00 h) at room temperature (22 ± 2°C), with free access to food and water. Rats were housed in group and adapted to these conditions for at least 1 week before experimental manipulation. All experiments were approved by the local authorities (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Miguel Hernández) and were performed in accordance with Spanish (law 32/2007) and European regulations (EU directive 86/609, EU decree 2001-486).

Stable, Gd-Fe containing, magnetic nanoparticles were synthesized in a two-step process. Initially, paramagnetic Gd<sup>3+</sup> and superparamagnetic Fe<sup>3+</sup> centers were combined in the structure of the PB analog Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (GF). Here, we controlled the resulting hybrid shape and size by means of varying incorporation of acetic acid, obtaining uniform, monodispersed

nanorods of about 100 nm average diameter (GF-1, no acetic acid) or a mixture of monodispersed nanocrosses and nanorods of 230 nm average diameter (GF-2, with acetic acid). Subsequently, isolated GF crystallites were coated with a thin silica layer by polymerization of TMOS at neutral pH in the presence of silicatein  $\alpha$  analogues (e.g., TEA), obtaining  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$  particles with the same shape and size than the pristine PB analog (respectively, GFS-1 and GFS-2). The sequence to obtain the different GFS samples is presented in Fig. 1. For the sake of comparison, we have included the alternative route corresponding to silicate polymerization over GF particles in alkaline medium, to give nanoparticles of  $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  composite [27,28]. Finally, for *in vivo* studies, GFS samples were silanized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and further reacted with PEG3 precursor to develop a PEG-decorated surface Gd-PB analog (GFS@PEG). An artistic representation of the final GFS-1@PEG material is presented in Fig. 1 inset.

### Material synthesis

**Synthesis of  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .**  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  precursor was prepared according to a known recipe [30]. Briefly, 3.3 g (10 mmol) of  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  and 6.3 g (30 mmol) of  $\text{Et}_4\text{NBr}$  were dissolved with 200 mL of methanol in a 500 mL flask connected to a nitrogen line, and stirred at 30° C for 3 days under  $\text{N}_2$  atmosphere. The mixture was filtered off and the filtrate was concentrated to approximately 10 mL by rotary evaporation. Resulting solution was stirred with 100 mL of ethyl ether and the yellow precipitate was collected by filtration. The crude was dissolved in 150 mL of refluxing acetonitrile and the solution was allowed to cool, obtaining  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . For nanosized PB analog preparation,  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.75 g, 1.7 mmol) were dissolved in 50 mL of ethanol:water (EtOH:H<sub>2</sub>O) mixture (2.5:1 v/v). Then, a solution of the previously synthesized  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1.0 g, 1.7 mmol, in 25 mL methanol) was added and the mixture was left a day at room temperature. The precipitate was filtered off, washed with ethanol and vacuum dried to yield 62 mg of an orange powder (GF-1). Alternatively,  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.75 g, 1.7 mmol) and  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (7.82 g, 235 mmol) were dissolved in 50 mL of EtOH:H<sub>2</sub>O (2.5:1 v/v) [30] and the synthesis was completed as described to give 82 mg of GF-2.

**Synthesis of  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]@\text{SiO}_2$ .** Silica coated GF samples were prepared by adding CPTMS (417  $\mu\text{L}$ , 2.19 mmol) to GF suspension (441 mg GF, 1 mmol, in 221 mL of EtOH:H<sub>2</sub>O mixture, 2.5:1 v/v) with vigorous magnetic stirring, to make vitreophilic GF surface. After 30 minutes, 1.1 mL of TMOS (7.29 mmol) and 44  $\mu\text{L}$  (0.31 mmol) of TEA were slowly added, to adjust pH 7. The resulting dispersion was allowed to stir for 24 h at room temperature. Afterwards, a

second equal addition of TMOS was carried out and the mixture was stirred for another 24 h. Finally, non-reacted silicate ions were thoroughly removed by subsequent centrifugation (484 g, 2 h), and the obtained orange solid was washed five times with EtOH:H<sub>2</sub>O mixture (2.5:1 v/v), and further freeze dried (-55 °C, 16 h).

**Synthesis of Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub>@PEG3.** PEGylation over GFS material was done by using a method previously described by our group [31]. 331 mg of GFS was dried at 80 °C and vacuum (8 torr) for 24 h. Then, 13.30 mL of anhydrous toluene was added and the mixture was heated to reflux. 646 µL (2.78 mmol) of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) was added and the mixture was stirred for 3 h. The obtained product was filtered off, washed with toluene and methanol and freeze-dried (-55 °C, 16h). Subsequently, 285 mg of the silanized material were suspended in 28.5 mL of anhydrous dichlorometane, and 356 µL of diisopropyl amine were injected under nitrogen atmosphere. Afterwards, 221 mg of PEG3 were added, and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the nanoparticles, suspended in 100 mL of ethanol with stirring. This suspension was filtered off and washed with ethanol (300 mL). Finally, the material was freeze-dried (-55 °C, 16 h).

#### **Material characterization**

Powder X-ray diffraction (XRD) patterns were collected in a Philips X'Pert diffractometer equipped with a graphite monochromator, operating at 40 kV and 45 mA and using nickel-filtered (Cu K $\alpha$  radiation  $\lambda = 0.1542$  nm). Liquid nitrogen adsorption isotherms of 200 mg of sample were measured in a Micromeritics Flowsorb apparatus. Surface area calculations were done by the BET method. Infrared spectra were recorded at room temperature in the 400–3900 cm<sup>-1</sup> region with a Nicolet 205xB spectrophotometer, equipped with a Data Station, at a spectral resolution of 1 cm<sup>-1</sup> and accumulations of 128 scans. Samples for transmission electron microscopy (TEM) were ultrasonically dispersed in a mixture EtOH:H<sub>2</sub>O (2.5:1 v/v) and transferred to carbon coated copper grids. TEM micrographs were collected in a JEOL JEM 2100F microscope operating at 200 kV. The quantitative EDS analysis was performed in an INCA Energy TEM 250 system from Oxford Instruments, working with a SDD X-MAX 80 detector. Field-emission scanning electron microscopy (FESEM) micrographs were collected in a ZEISS Ultra 55 microscope operating at 2 kV, with a  $2 \times 10^{-9}$  A beam current and 2.5 mm as the working distance. Particle size and Z-Potential measurements were conducted by diffuse light scattering (DLS) in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Dried material was re-suspended at a concentration of 5 µg/mL in deionized water or phosphate buffer saline (PBS) and measurements were performed at 25 °C. The mean hydrodynamic diameter was

determined by cumulant analysis. Organic and water content in as-prepared material were calculated from elemental analysis (FISONS, EA 1108 CHNS-O) and thermogravimetric (TGA) measurements (Mettler-Toledo TGA/SDTA851e).

GFS@PEG material stability in isotonic medium was monitored by dialysis solution assay in aqueous glucose (5.0 wt%) and simulated body fluid (SBF) [32] 11 mg of the corresponding material were introduced in a dialysis tubing with 2 mL of glucose solution. Then, filled dialysis tubing was inserted in a glass bottle with 50 mL of fresh solution, and the system was stirred at 90 rpm and 37°C in a thermostatic bath for seven days, changing the bottle solution by fresh solution at the corresponding sample time. Subsequently, leached Fe<sup>3+</sup> concentration was analyzed by inductively coupled plasma (ICP, Varian 715-ES) or inductively coupled plasma mass spectrometry (Varian 820-MS).

### **Relaxivity measurements and *in vitro* MRI**

Relaxivity determinations were carried out in a clinical Phillips 3 T MRI unit (Achieva 3 T X-Series; Philips Healthcare, The Netherlands) using a 8-channel phased array head coil, and in a Bruker 9.4 T spectrometer (AV400) working with a 90° pulse of 5 μs and a recycle delay of 5 s. T1 and T2 relaxation times were measured using inversion recovery and cpmg pulse sequences respectively. For the *in vitro* MRI study (Philips Achieva 3 T X-Series), the phantom was scanned with single slice in coronal orientation obtaining transversal view of all tubes filled with variable CA concentration in a xanthan gum solution (0.1 wt%). Geometric parameters remain equivalent between T2 and T1 estimation sequence (Field of View –FOV- 220x220 mm<sup>2</sup>, slice thickness 5 mm and 1.0 x 1.0 mm<sup>2</sup> in plane resolution) sharing the same spatial localization. Multi-echo spin echo sequence was used to estimate T2 values acquiring 32 echoes ranging from 14 to 231 ms (TE=7 ms) with a Repetition Time (TR) of 2000 ms. T1 values of each tube were estimated using a look-locker inversion recovery acquisition with 107 inversion times ranging from 6.51-5306.51 ms, with an inversion time interval of 50 ms. A new inversion pulse was applied every 6 s to avoid signal saturation due to extremely close inversion pulses. To reduce the influence of readout excitation pulse in the final T1 values, an excitation flip angle of 5° was applied during the TFE shot. 33 T2 maps were generated by a pixel by pixel nonlinear fitting of the signal acquired at every Echo Time (TE) to a mono-exponential model. T1 maps were generated by pixel by pixel nonlinear fitting of the signal acquired at every inversion time to the signal model of ref. 30. Quantitative values were obtained in aqueous xanthan gum (0.1 %) nanoparticle suspensions. For each tube, a circular ROI was placed manually over T2 and T1 maps avoiding the border. For each ROI, mean and standard deviation were computed for further comparison.

The resulting T1 and T1 values were averaged and plotted as 1/Ti (s-1) where i=1, 2 against the experimentally calculated metal concentration (mM), [Gd<sup>3+</sup>] for T1 and [Fe<sup>3+</sup>] for T2. The slopes of these graphs provided the specific relaxivities  $r_1$  and  $r_2$ .

### **Cytotoxicity assay**

The different cell lines were cultured in 96-well cell culture plates with the seeding densities shown below in a final medium volume of 200  $\mu$ L/mL: HeLa 10000 cells/well; 3T3 and 42-MGBA 50000 cells/well and SH-SY5Y 100000 cells/well. HeLa cells were grown in MEM (Earle's), 3T3 cell line in DMEM, 42-MGBA cell line in MEM (Earle's) and RPMI 1640 (1:1), and SH-SY5Y cell line was cultured in a DMEM and Ham (F12) Nut MIX (1:1). Cell mediums were supplemented with 10% FBS and Pen-Strep 1:100 (v/v). The plates were cultured 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> injection in air. After 24 h cells were treated with variable concentrations of the CA (0.25-100  $\mu$ g/mL in RPMI medium). Culture medium was used as negative control. Cells were incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 24 h.

Cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. 200  $\mu$ L/well of MTT/PBS (1 mg/mL) were added and the plates were incubated at 37 °C for 3 h. Formazan crystals were dissolved with 100  $\mu$ L DMSO and then absorbance at 595 nm was measured with a 1681130 iMark™ Microplate Reader. Absorbance values were normalized with respect to the controls and expressed in percentage using the next equation:

$$\text{Relative cell viability} = \frac{OD_{595 \text{ TEST SAMPLE}}}{OD_{595 \text{ CONTROL}}} * 100$$

Data statistical analysis was performed applying arithmetic means and error bars of statistical error means (SEM) using Matlab (MathWorks). IC<sub>50</sub> calculation survival data were calculated by nonlinear regression sigmoidal dose–response (variable slope) curvefitting using Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA). At least three independent experiments were performed for every sample, and each experiment was carried out by triplicate.

### **In vivo MRI study**

Experiments were carried out in a horizontal Bruker 7 T scanner with a 30 cm diameter bore (Biospec 70/30v, Bruker Medical, Ettlingen, Germany). The system had a 675 mT/m actively shielded gradient coil (Bruker, BGA 12-S) of 11.4 cm inner diameter. A 1H rat body receive-transmitter resonator (Bruker BioSpin MRI GmbH, Germany) was employed. Data were acquired with a Hewlett-Packard console running Paravision software (Bruker Medical GmbH, Ettlingen,



Germany) operating on a Linux platform. Rats were anesthetized in an induction chamber with 3-4% isoflurane in medical air (0.8-1 L/min) and maintained with 1-2 % isoflurane (IsoFlo) during the MRI experiment. Anesthetized animals were taped down in a custom-made animal holder to minimize breathing-related movement artifacts. Body temperature was kept at 37 °C using water blanket and animals were monitored using a MRI compatible temperature control unit (MultiSens Signal conditioner, OpSens, Quebec, Canada). Breathing rate was also measured using a customized device.

Studies were performed by injecting 1 mL of the CA suspension (5 mg mL<sup>-1</sup>) into the catheterized tail vein as a single bolus (0.05 mmol Gd/kg body weight, 0.05 mmol Fe/kg body weight). T2 weighted anatomical images to position the animal were collected in the three orthogonal orientations using a rapid acquisition relaxation enhanced sequence (RARE), applying the following parameters: FOV 40 x 40 mm, 15 slices, slice thickness 1 mm, matrix 256 x 256, effective TE (TE<sub>eff</sub>) 56 ms, TR 2 s, 1 average and a total acquisition time of 64s [34,35]. Two types of images were used to assess the effect of CA in the SI in T1 and T2 weighted images. For the former, FLASH images were acquired with the following parameters: 25 slices, 1.5 mm slice thickness, TR 197 ms; TE 2.7 ms; FOV 6.0x5.0 cm; matrix 128x108; 4 averages; total acquisition time 90 s. Three images were acquired before CA administration (baseline) and 20 after it. For the T2 weighted images, RARE sequence was used with the same geometry than T1 weighted images and the following parameters: TR 2800 ms; TE 48 ms; FOV 6.0x5.0 cm; Mtx 256x214; 8 averages; total acquisition time 600 s. One of these images was acquired at the beginning (baseline) and one at the end of the experiment. Data were analyzed with Image J (W. S. Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 19972005).

#### **Pathological investigation after MRI**

After *in vivo* MRI experiments, rats were euthanized and samples of lung, heart, liver and spleen were collected for subsequent histological analysis. These organs were immersed in 4% paraformaldehyde for 24-48 h. Tissues were then included in paraffin and cut with a microtome 5-7 µm thickness slices. Finally, these sections were deparaffinized and stained with Hematoxylin/Eosin staining. Histology images were taken using Olympus AX70 microscope.

## Results and discussion

### Synthesis and characterization of stable Gd-Fe based magnetic nanoparticles

The strategy to obtain GFS hybrids is comparatively depicted in Fig. 1. As commented, in this synthesis scheme there are two crucial points to be accomplished: i) the role of acetic acid in shape and size distribution; and ii) an accurate pH control during silicate polymerization.  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$  nanocrystals with well-defined morphology can be obtained with dual shape (e.g., crosses and rods, with an average diameter over 260 nm, and shape ratio of about 1:2, as determined by TEM) or like single nanorods (over 95 nm average diameter) (Table S1 in Supplementary Information). A possible mechanism for nanocrosses formation indicates that  $Et_4N^+$  works as a cationic surfactant, cooperating in the synthesis with acetic acid to function as a soft template that forces Fe-CN-Gd crystals to assemble in the cross morphology [36] Actually, in the absence of carboxylic acid, only small and uniform rods grow.

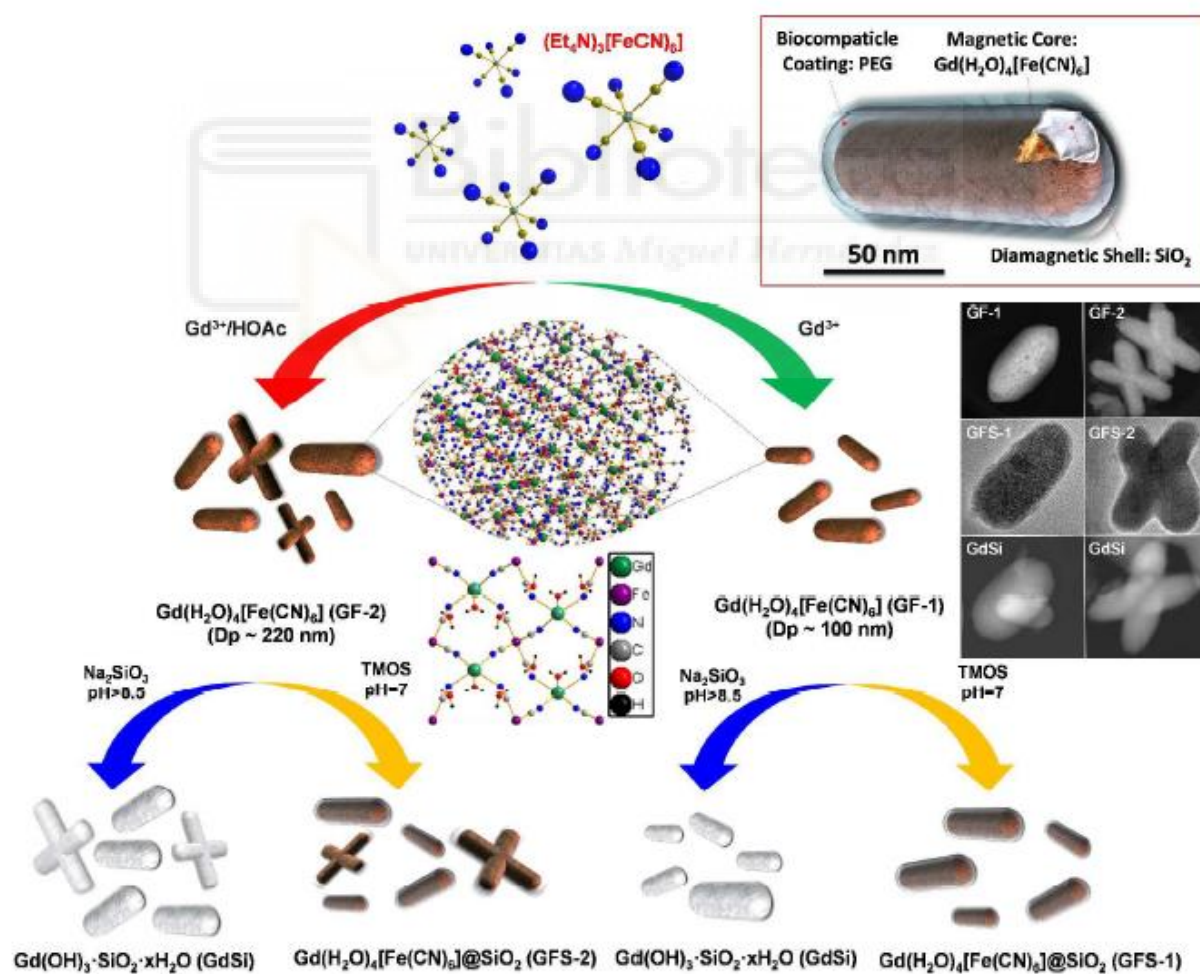


Fig. 1. Sequence of the stepwise biomimetic strategy followed to obtain GFS materials and alternative synthetic routes. The inset shows an artistic representation of final GFS- 1@PEG nanoparticles.

On the other hand, the obtained GF compound is partially soluble in water, but is stable in EtOH:H<sub>2</sub>O mixture (2.5:1 v/v). However, if the silica coating process is carried out with sodium silicate (pH>8.5), an ion exchange reaction takes place, resulting in complete GF dissolution and concurrent Gd(OH)<sub>3</sub> precipitation. By overlapping this process with silicate hydrolysis and condensation, a simultaneous and stoichiometric condensation of Gd(OH)<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> takes place, yielding the nanocomposite Gd(OH)<sub>3</sub>·3SiO<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O (Fig.1) [27,28]. Conversely, under neutral pH obtained by a biomimetic synthetic strategy that takes advantage of silicatein  $\alpha$  functional analogues as TEA, silica wall grows homogeneously over CPTMS-functionalized GF nanoparticles, to give GFS material. No significant GF compound solution is observed during the coating process (iron leaching quickly stains the medium in yellow), resulting in Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]@SiO<sub>2</sub> particles with same morphology and similar size distribution than pre-formed PB analog crystals. At this point, a slight increase in particle average diameter is observed in the case of GFS-1 sample small rods. However, GFS-2 suffers some particle size reduction after silica coating, which may be attributed to partial destruction of some bigger nanocrosses during the treatment (as confirmed by the drop in crosses/rods ratio, see Table S1 in Supplementary Information). These silica protected nanoparticles are expected to be stable in aqueous medium, in agreement with a Z-Potential lower than -10 mV (Table S1 in Supplementary Information). Nevertheless, DLS hydrodynamic diameter of GFS samples in water (GFS-1=124.7±81.9, GFS-2=343.7±154.1) is significantly larger than TEM measurements (GFS-1=106.7±33.5, GFS-2=230.3±35.5) (Fig. S1 in Supplementary Information), which is due to some particle aggregation in water, with the polydispersity index (PDI) varying from 0.2 to 0.4 (Table S1). In addition, the stability in PBS is clearly compromised by the high ionic strength of this medium, leading to very unstable suspensions where aggregation takes place in large extension (PDI=1, Table S1). This is notably overcome by PEGylating the samples (0.05-0.06 mmol PEG3/g, as determined by TGA). Obtained DLS hydrodynamic diameters for GFS@PEG samples (GFS-1@PEG=111.4±62.7, GFS-2@PEG=228.9±79.3) are very similar to real size determined by TEM (Fig. S1), and PDI values are clearly lower than GFS suspensions (Table S1). Moreover, PEGylation significantly reduces aggregation in PBS (although does not fully suppress it), allowing to prepare reasonably stable suspensions of these nanoparticles. Besides, PEGylation contributes to minimize the immunogenic reaction under iv administration [31]. Powder X-Ray reports reveal that GF structure is fully retained after the silica coating process (Fig. S2 in Supplementary Information). Also, the final PEGylation step does not involve any significant change in the XRD pattern. Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] crystallizes in the orthorhombic system with C<sub>2</sub>cm space group and cell parameter of a = 7.4016(3) Å, b = 12.78813(14) Å, and c

= 13.5980(12) Å. In addition, it is remarkable that the nanosized material XRD patterns are fully comparable to that of the bulk compound [23].

Electronic microscopy study (Fig. 2) confirms the formation of monodispersed nanoparticles with a thin (6-10 nm width), continuous and homogenous silica shell over Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] core. EDS analysis is consistent with the expected PB analog stoichiometry (Gd:Fe atomic ratio = 1), although there are small deviations that we attribute to the accuracy of the analytical technique over single nanoparticles. Moreover, the spatial distribution of Si, Gd and Fe in isolated particles can be observed by elemental mapping (Fig. 2i-l), which illustrates the homogeneous distribution of Gd and Fe in the core, as well as the solely presence of Si at the shell. This can be clearly stated in Fig. 2d, which shows EDS line scans corresponding to the different elements present inwards (Gd, Fe) and outwards (Si). In addition, no change is observed in the closely packed structure of the PB analog and estimation of interplanar distance over the [112] plane by TEM matches reasonably well the theoretical calculation from Bragg's law (Fig. 2g-h). FTIR reports display two peaks at 2140 and 2150 cm<sup>-1</sup> corresponding to stretching vibration of Fe-CN-Gd bond, and an additional st vibration at 2070 cm<sup>-1</sup> (Fig. S3 in Supplementary Information). The low energy signal is originated from ferrocyanide [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>, which is probably generated by ferricyanide [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> reduction by alcohol during the synthesis [36].

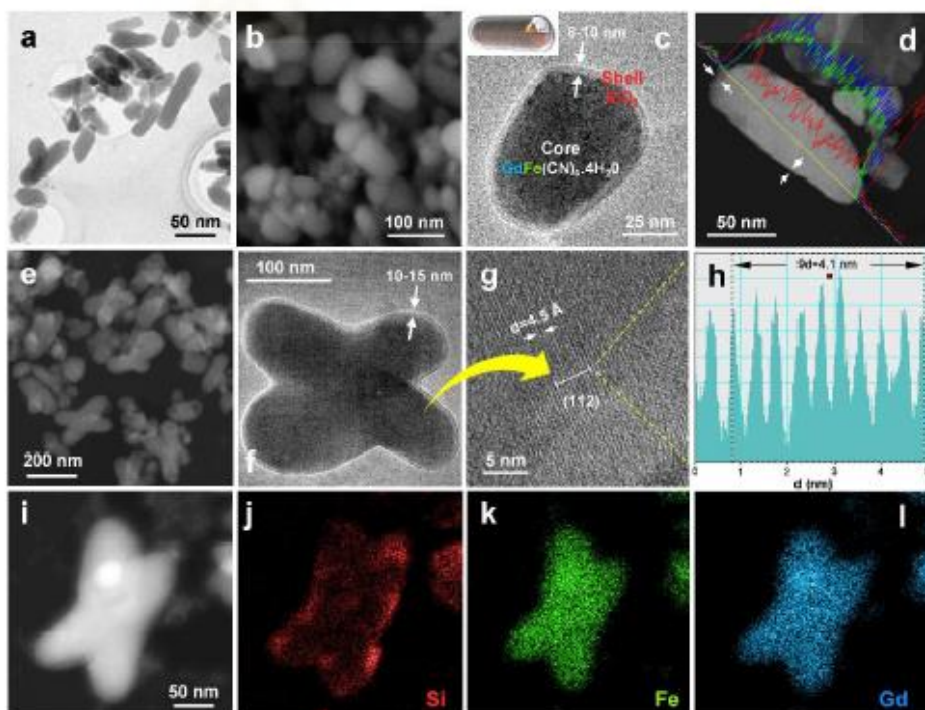


Fig. 2. Electron microscopy study of as-synthesized GFS materials. (a,b): GFS-1 sample general images by TEM (a) and FESEM (b). (c) High resolution TEM image of a GFS-1 nanorod showing its core-shell nature. The inset shows an artistic representation. (d) EDS line scans of a GFS-1 nanorod depict the changes in composition from particle outer surface to the inner core. (e) GFS-2 sample general image by STEM. (f) High resolution TEM image of GFS-2 nanocross showing its core-shell nature. A magnification of this picture in (g) allows to observe the PB analogue closely packed structure at the [112] plane. Also, interplanar distance calculation by TEM over 10 sheets (h) matches quite good the theoretical calculation from the Bragg's law. (i-l) EDS elemental mapping pictures of a GFS-2 nanocross.

Small peaks in the range  $1610\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  are assigned to  $\delta$  (H-O-H) vibration [37]. Conversely, a sharp  $\nu$  (H-O) signal is present at  $3610\text{ cm}^{-1}$  and an intense broad band  $\nu$  (H-O-H) is observed in the range  $3000\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ . After endowing the GF particles with the silica coating, a new broad signal centered at  $1085\text{ cm}^{-1}$  appears, corresponding to  $\nu$  (Si-O-Si) vibration. In addition, PEGylated samples show small peaks in the range  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ , which are due to  $\nu$  (C-H) of methylene groups.

The silica coating reveals itself crucial for the stability of these hybrids in physiological fluids. GF material is partially soluble in water and physiological fluids, leaching significant quantities of metal cations over a short period. To study this we dispersed GFS-1@PEG at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in isotonic glucose 5 wt% medium or in SBF and monitored the leached metal concentration by ICP/ICP-MS (Fig. S4 in Supplementary Information). Unfortunately, in these testing conditions, most of the released  $\text{Gd}^{3+}$  is quickly precipitated as  $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , remaining in the dialysis bag as a white powder, so the obtained  $\text{Gd}^{3+}$  concentration in dialysis samples is very low and can't be used as a pattern of metal leaching (total  $\text{Gd}^{3+}$  quantity measured in solution by ICP-MS was lower than 0.5 %). In this context, Fig. S4 in Supplementary Information shows only  $\text{Fe}^{3+}$  leaching in glucose 5% solution (as determined by ICP) and in SBF (as determined by ICP-MS). We observed negligible metal leaching in the first 4 h (<1 %) and about 5-11 % at 24 h, which makes this material suitable for *in vivo* MRI (image acquisition takes place no longer than 1-2 hours after iv administration). Furthermore, even after 7 days, the concentration of leached metals was lower than 25% in both mediums. This is also important, as it implies very slow particle degradation, which should allow almost complete particle elimination by renal and biliary routes before reaching toxicity [39].

It is noticeable that the coating process is determinant not only to prevent PB analog solution in aqueous medium, but also to increase hybrid surface area, as the highly packed Gd-Fe structure is difficult to functionalize with organic ligands. In this sense, the adsorption pattern obtained from the nitrogen isotherms over silica covered samples correspond to amorphous, non-porous

materials, with an external surface area over  $60 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  (Table S1 and Fig. S5 in Supplementary Information). This is enough for subsequent incorporation of different functionalities, as therapeutic agents, targeting compounds and/or PEG molecules.

### Relaxivity measurements and *in vitro* MRI

The efficacy of GFS material as T1- and T2 MRI CA was evaluated by measuring the longitudinal ( $r_1$ ) and transversal ( $r_2$ ) nuclear magnetic relaxation rates of water proton in aqueous suspensions at room temperature and magnetic field of 3 T and 9.4 T. Stable colloids were prepared in aqueous xantham gum (0.1 wt%) solution with  $\text{M}^{3+}$  concentration in the range 0-1.00 mM ( $\text{Gd}^{3+}$  for T1,  $\text{Fe}^{3+}$  for T2). Relaxivity values were determined by using the following expression: [40]

$$\frac{1}{T_{i(w)}} = \frac{1}{T_{i(0)}} + r_i C$$

Where  $i = 1$  or  $2$  values, respectively, for longitudinal or transversal-weighted effect of CA.  $1/T_{i(w)}$  is the global relaxation rate constant of bulk water molecules,  $T_{i(0)}$  is the water relaxation time without CA, and  $C$  is the paramagnetic ion concentration.  $r_1$  and  $r_2$  values were determined, respectively, from the slopes of  $1/T_1$  ( $\text{s}^{-1}$ ) and  $1/T_2$  ( $\text{s}^{-1}$ ) versus  $\text{M}^{3+}$  concentration (Table 1 and Fig. S6 in Supplementary Information). For the sake of comparison, same measurements were carried out with commercial CA gadopentetate dihydrogen salt (Gd-DPTA, Sigma-Aldrich). GFS-1 and GFS-2 show high  $r_1$  and  $r_2$  values at high magnetic field (9.4 T), of about 1 order superior to that of Gd-DPTA (Table 1).

**Table 1** Longitudinal and transverse relaxivities of hybrid GFS materials.

| Sample                          | $r_1$<br>( $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ ) | $r_2$<br>( $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ ) | $r_2/r_1$ |
|---------------------------------|---|---|-----------|
| <b><math>B_0=9.4</math> (T)</b> |   |   |           |
| Gd-DTPA                         | 4.4   | 4.6   | 1.04      |
| GFS-1                           | 13.1  | 66.6  | 5.1       |
| GFS-2                           | 11.7  | 58.6  | 5.0       |
| GFS-1@PEG                       | 20.8  | 69.9  | 3.4       |
| GFS-2@PEG                       | 16.7  | 59.6  | 3.6       |
| <b><math>B_0=3.0</math>(T)</b>  |   |   |           |
| Gd-DTPA                         | 3.8   | 3.0   | 0.8       |
| GFS-1@PEG                       | 27.0  | 35.1  | 1.3       |

A dramatic T2 reduction is expected with regards to the commercial chelate due to the presence of a huge population of Fe<sup>3+</sup> centers in GFS samples. However, the increased  $r_2$  value compared to mononuclear species of Gd<sup>3+</sup> is mostly due to the spin order of Gd<sup>3+</sup> runs parallel to the local magnetic field induced by the superparamagnetic Fe<sup>3+</sup> center domains under an external magnetic field [17]. Also, the partial contribution of T1 shortening by Fe<sup>3+</sup> sites may enhance T1 contrast effect. This synergistic effect is possible by the extremely dense Gd<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ion packaging at the same crystalline structure, which are connected via cyano-bridge bonds [23]. Actually, a perspective view of the network topology of GF structure at Fig. 3 shows two different Gd-Fe non-bonding distances, estimated as 5.509 and 5.352 Å. A similar synergistic effect has been observed when embedding Gd oxide crystallites into iron nanoparticles [21,26], and also in other similar materials [41].

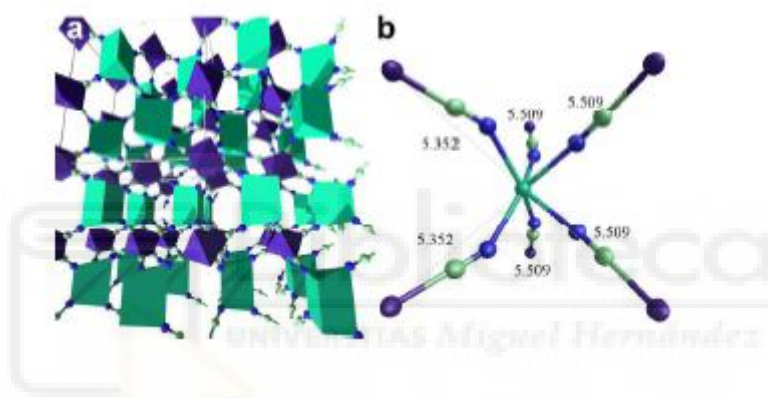


Fig. 3. (a) Perspective view of the network topology of Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], where water molecules have been removed. Gd, is at the center of the green triangular prisms; and Fe is at the center of the octahedra. When water is considered, two water molecules coordinate to each Gd atom giving a square anti-prism coordination for Gd. (b) Perspective view of the structure and coordination of a Gd atom in the Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] structure. Two water molecules have been omitted for clarity. Two different non-bonding distances Gd-Fe appear, 5.509 Å (4) and 5.352 Å (2).

At this point, we are aware of the fact that the external silica coating could be an issue over the magnetic properties of GFS samples, mostly over longitudinal relaxation. According to Solomon-Bloembergen-Morgan theory, T1 shortening is related to directly bound water molecule interactions over magnetic centers, corresponding to the inner sphere relaxation mechanism [7,8]. This interaction is hindered in nanoparticles fully covered with an homogeneous and non-porous silica shell. However, contrast agents can display relaxivity even when there is no water in the inner coordination sphere, and in this case the relaxivity comes from outer sphere contributions, where water molecules hydrogen bonded to silica surface are relaxed via dipolar mechanisms [42].

Moreover,  $r_1$  gain is clearly higher for PEGylated samples (of about 60% for GFS-1 and 45% for GFS-2, Table 1). As T1 shortening is mainly related to the chemical exchange of protons with  $M^{3+}$  centers at the water sphere regime, it should improve when particle external surface area increases [7,8,42]. In this context, PEGylation may stabilize the magnetic colloid by reducing particle aggregation and hydrodynamic diameter (Table S1 and Fig. S1 at the Supplementary Information), which promotes surface interaction with water molecules. Here, other authors have reported the strong effect of PEGylation over water exchange and water molecule access to  $Gd^{3+}$  centers, and its influence over longitudinal relaxivity [43]. Conversely, PEGylation shows a modest effect over transversal relaxivity (a very short increase of 2-4% at  $B_0 = 9.4$  T, Table 1), as  $r_2$  is little dependent on metal ion hydration, mean residence time of the water molecule in the first coordination sphere, and the tumbling rate of the species.

In the same line, the modest  $r_1$  increase in GFS-1 and GFS-1@PEG hybrids with regards, respectively, to GFS-2 and GFS-2@PEG samples is assumed as consequence of the smaller particle size [44]. Such effect is even stronger at lower magnetic field intensity (3 T), with the  $r_2/r_1$  ratio getting close to 1 (GFS-1@PEG sample, Table 1). This, together with a relatively high  $r_2$  value prompt the use of GFS material as T1-T2 dual-modal MRI CA.

To further check this capability, phantom MRI images with GFS-1@PEG sample (Fig. 4) were collected. For the purpose of comparison, two regular T1-agents, commercial Gd-DTPA chelate ( $r_1 = 4.1$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>,  $r_2 = 3.3$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) and Gd-Si oxide nanoparticles (GdSi,  $r_1 = 5.6$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>,  $r_2 = 8.2$  mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) [28], were also tested. The phantoms were scanned with a single slice in coronal orientation. Fig. 4a shows the T1-weighted images of the different materials at variable CA concentration based on  $Gd^{3+}$  content. Both GdSi and Gd-DTPA display a similar signal enhancement depending on concentration. However, GFS-1@PEG presents a much stronger contrast effect, due to the described synergistic effect between  $Gd^{3+}$  and  $Fe^{3+}$  magnetic centers. Such differences are stressed in a T1-weighted image of a single slice in transversal orientation obtained at 1 mM of  $Gd^{3+}$  (Fig. 4b). In addition, Fig.4c presents the T2-weighted images corresponding to these samples at variable  $M^{3+}$  concentration ( $Gd^{3+}$  for GdSi and Gd-DTPA,  $Fe^{3+}$  for GFS-1@PEG). As expected, the GFS hybrid exhibits superior dark contrast performance due to the presence of  $Fe^{3+}$  superparamagnetic centers.



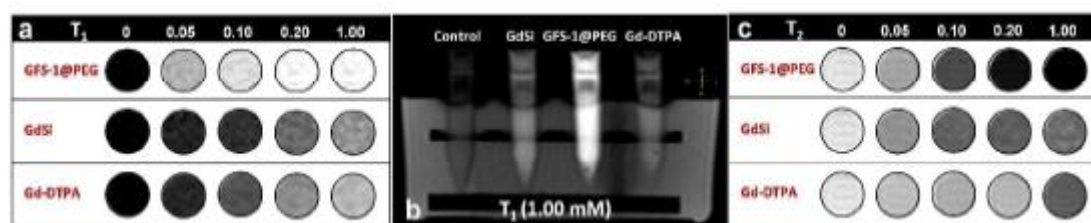


Fig. 4. Phantom MRI images of GFS-1 sample and two regular T1-agents, commercial Gd-DTPA and Gd-Si oxide nanoparticles (GdSi).28 (a) T1-weighted MRI coronal slices at magnetic field of 3 T and echo time of 2 ms over varying  $Gd^{3+}$  concentration. (b) T1-weighted MRI transversal slice at magnetic field of 3 T and echo time of 2 ms over  $Gd^{3+} = 1$  mM. (c) T2-weighted MRI slices at magnetic field of 3 T and echo time of 203 ms over varying  $M^{3+}$  concentration ( $Gd^{3+}$  for GdSi and Gd-DTPA,  $Fe^{3+}$  for GFS-1).

### Cytotoxicity study

To validate GFS nanoparticle potential performance in a biological environment, cell viability was assessed 24 h after incubation with the GFS-1 sample by determination of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) conversion to its formazan form, by following standard procedures. We used healthy fibroblasts (3T3 cell line) and three different cancer cell lines (HeLa cells, 42-MG-BA glioblastoma multiforme cells and SH-SY5Y neuroblastoma cells) at a range of concentrations (0.25- 100  $\mu g mL^{-1}$ ). Results (Fig. S7 in Supplementary Information) indicate that even at the highest particle loading, relative cell viability was above 70%. Actually, despite MTT testing inherent limitations for accurate cell viability determination, these results correspond to an acceptable biocompatibility profile [45].

### *In vivo* dual T1 and T2-weighted MRI

Direct *iv* administration of GFS-1 nanoparticles is precluded due to the immediate and strong reaction with serum proteins, which results in protein corona formation. This promotes subsequent interaction with cell elements of the reticuloendothelial system, and rapid particle clearance from blood, which are accumulated mostly in liver, spleen and lungs [46]. In order to minimize this non-specific immunogenic process, GFS-1 nanorods were modified with a short PEG chain, according to a known recipe [31], to give GFS-1@PEG. This way, nanoparticles are expected to prolong their blood circulation time, finally being eliminated mainly by renal (urine) and hepatic (biliary) routes [38,47]. Subsequently, 1 mL of a 5 mg mL<sup>-1</sup> GFS-1@PEG stable colloid in glucose 5% was perfused into the catheterized tail vein of healthy male Sprague-Dawley rats as a bolus ( $\sim 0.05$  mmol Gd kg<sup>-1</sup> and 0.05 mmol Fe kg<sup>-1</sup>). After 30 min, T1- and T2-weighted images were acquired for 1 h by using a 7 T horizontal scanner. Previously to CA administration images, baseline images were processed.

Fig. 5 shows coronal T1- and T2-weighted MRI before (baseline) and after CA. For the sake of clarity, the different regions of interest (ROIs) presenting the most significant signal to noise ratio (SNR) changes have been manually labeled over pre-injection images. SNR changes are compiled in Table 2. T1-weighted images show clear positive signal enhancement in liver ( $\Delta\text{SNR} = 17.3\%$  relative to baseline, Fig. 5a,a') and kidneys ( $\Delta\text{SNR} = 6.4\%$ , Fig. 5c,c'). This is not surprising as these organs receive most of the blood stream, which favors highly promoted particle accumulation. Despite its large size and lobular shape, liver presented mostly uniform changes in SI, which corresponds to a homogeneous nanoparticle biodistribution over the entire organ. In addition, T2-weighted images present strong negative contrast for liver ( $\Delta\text{SNR} = 27.8\%$ , Fig. 5b,b'), gallbladder ( $\Delta\text{SNR} = 78.0\%$ , Fig. 5b,b') and kidneys ( $\Delta\text{SNR} = 51.7\%$ , Fig. 5d,d'). In all cases, the contrast enhancement remains fully stable during the whole acquisition time (1 h), although a significant extension of acquisition period should be feasible.

Table 2 Magnitude of the normalized changes in the signal to noise ratio (SNR) of T1- and T2 weighted images after *iv* administration of GFS-1@PEG in a Sprague-Dawley rat ( $0.05\text{ mmol Gd Kg}^{-1}$  and  $0.05\text{ mmol Fe Kg}^{-1}$ ). Values correspond to mean  $\Delta\text{SNR}$  averaged over 15 min after the injection.

| Region of Interest        | $\Delta\text{SNR}$<br>(%) |
|---------------------------|---------------------------|
| <b>T1-weighted images</b> |                           |
| Liver                     | 17.3                      |
| Gallbladder               | 0.1                       |
| Paraspinous muscle        | 3.0                       |
| Kidney                    | 6.4                       |
| <b>T2-weighted images</b> |                           |
| Liver                     | 27.8                      |
| Gallbladder               | 78.0                      |
| Paraspinous muscle        | 6.3                       |
| Kidney                    | 51.7                      |

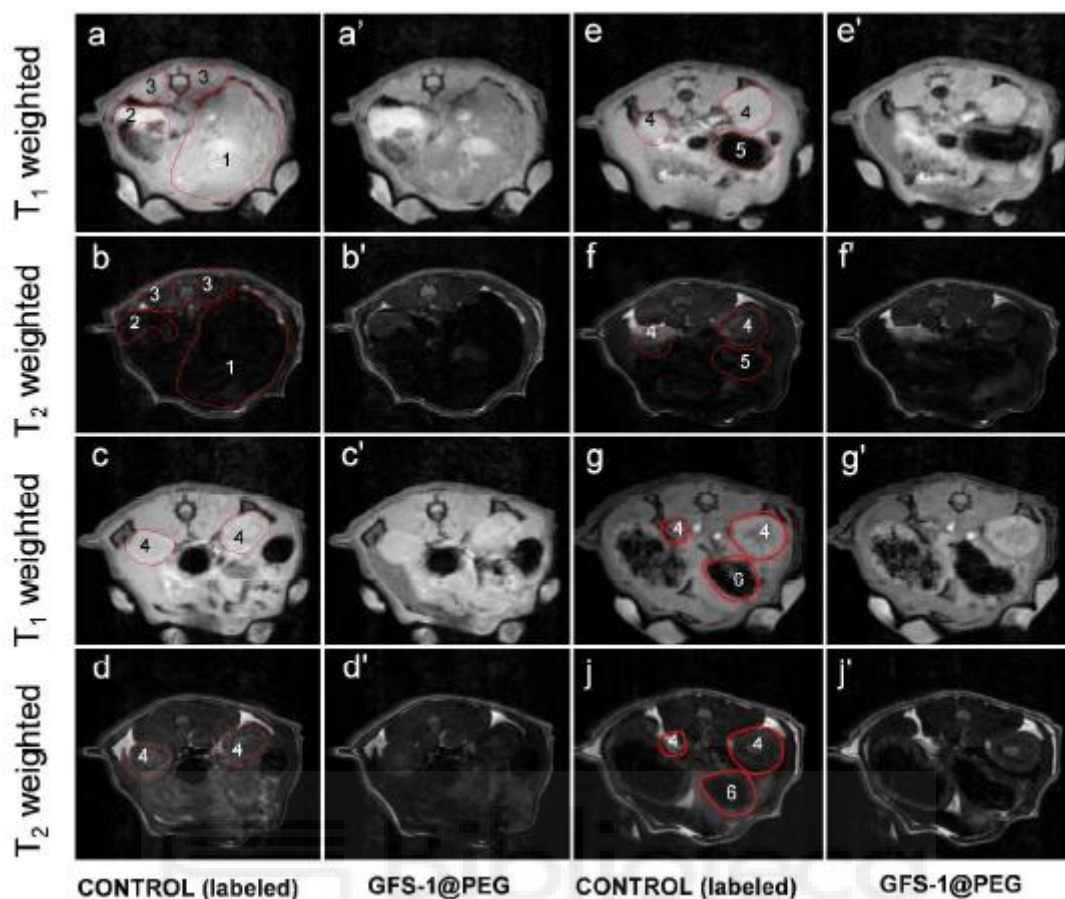


Fig. 5. *In vivo* coronal T1- and T2-weighted images acquired from a male Sprague-Dawley rat at 7 T magnetic field. (a-j) Control (baseline) with no MNP administration. The following ROIs have been manually labeled (red lines): 1-liver; 2-gallbladder; 3-paraspinous muscle; 4-kidney; 5-stomach; 6-pancreas. (a'-j') Acquisition 30 min after GFS-1@PEG nanorod injection ( $0.05 \text{ mmol Gd}^{3+} \text{ kg}^{-1}$ ,  $0.05 \text{ mmol Fe}^{3+} \text{ kg}^{-1}$ ).

Furthermore, no structural or cellular abnormalities were detected in lung, heart, spleen and liver slices of treated animals. Fig. 6 shows some representative examples of histological sections in a CA administered rat (Fig. 6a-h) and the same histological plates for a non-administered specimen (control, Fig. 6i-p).

Liver histology (Fig. 6a,b and 6i,j) does not display haemorrhages in hepatic vein and arteries, neither shows damage or abnormalities in the liver lobules cells or structure. No abnormalities were seen in spleen histology (Fig. 6c,d and 6k,l) in the white and the red pulp. Lymph nodes structure was normal and no signs of haemorrhages or high immune system activity were observed.

Also, heart myocardium histology was not been affected by the CA (Fig. 6e,f and 6m,n). Regarding pericardium and endocardium, both structures were kept intact after agent contrast

administration (images not shown). Finally, lung histological slices (Fig. 6g,h and 6o,p) showed no pulmonary failure signs and intact alveolar and bronchial structures.

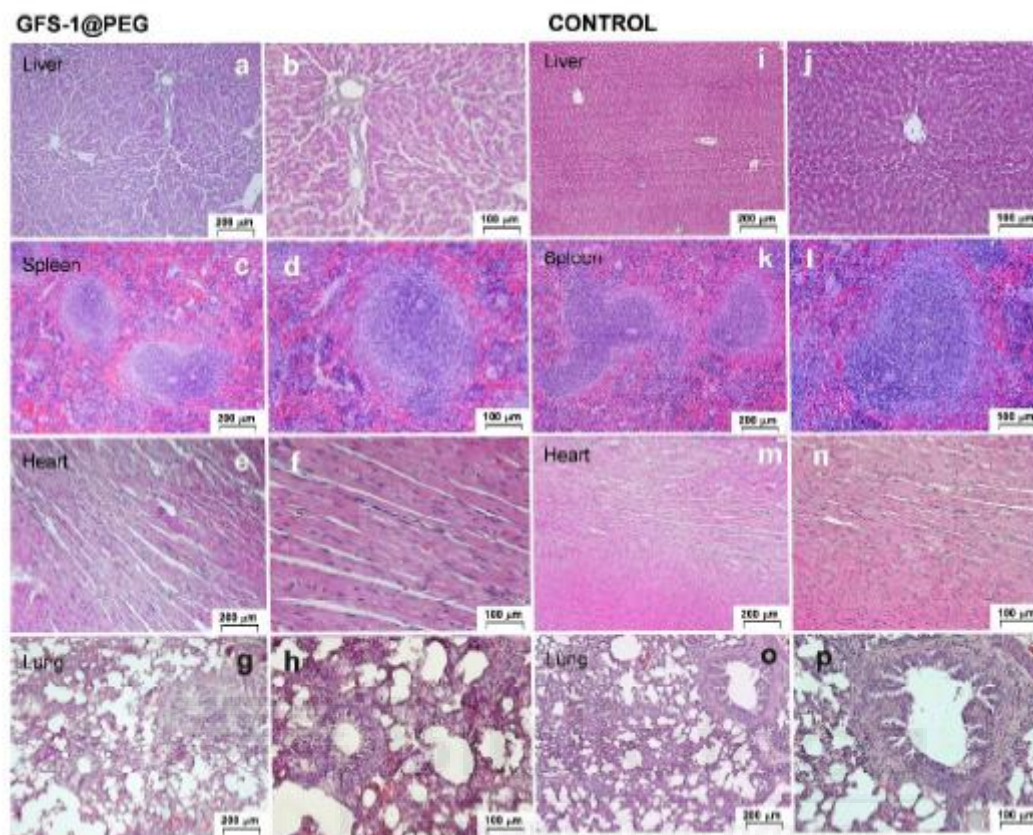


Fig. 6. (a-h) Hematoxylin/eosin staining of histological slices after administration (single bolus) of GFS-1@PEG ( $0.05 \text{ mmol Gd}^{3+} \text{ kg}^{-1}$ ,  $0.05 \text{ mmol Fe}^{3+} \text{ kg}^{-1}$ ). (i-p) Same histological slices in a control specimen.

Overall, these findings indicate that PEGylated GFS material is highly biocompatible dual CAs able to provide both positive T1 and negative T2 contrast enhancement in MR imaging. This is a consequence of the GFS improved characteristics as MRI CA, presenting consistent stability in biological fluids and high longitudinal and transversal relaxivity values due to the synergistic effect between  $\text{Gd}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  centers in a closely packed crystalline structure.

## Conclusions

The incorporation of T1 and T2 active moieties in a CA for dual-modal MRI provides complementary information that can help to improve the safety of diagnosis. In this sense, we have developed a novel hybrid material with high performance as MRI CA by optimizing the synthesis of  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  magnetic nanoparticles with controlled size and morphology, covering them with a thin diamagnetic silica layer by following a biomimetic strategy for silicate hydrolysis and polymerization at neutral pH. The obtained system shows long-term stability in

physiological fluids because of the protecting nonporous outer shell. This material presents longitudinal relaxivity values over one order superior to regular T1 Gd<sup>3+</sup> based systems and much stronger positive contrast in *in vitro* and *in vivo* MR images, due to the synergistic effect between Gd<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup> magnetic centers closely connected via cyano-bridge bonds in a highly packed crystalline structure. In addition, the GFS hybrid exhibits transversal relaxivity data comparable to that of iron oxide nanoparticles, which provides strong dark contrast performance in *in vitro* and *in vivo* MRI. The lack of cytotoxicity checked in different cell lines and the absence of histological damage observed in the main organs of tested animals indicate a good biosafety profile, stressing the potential of this CA in clinical applications. With regards other proposed T1-T2 dual mode CAs, these nanoparticles present very homogeneous composition and constant Gd:Fe atomic ratio, providing reproducible quality in MRI signal.

### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

### Acknowledgements

Financial support of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (projects TEC2016-80976-R and SEV-2016-0683) is gratefully acknowledged. Dr. E.M. Rivero thanks the Cursol Foundation for a post-doctoral scholarship. A.C.G. also thanks the La Caixa Foundation for a Ph.D. scholarship. We fully appreciate the assistance of the Electron Microscopy Service of the UPV and INSCANNER S.L.

### References

- 1 P. J. Bolan, M. T. Nelson, D. Yee and M. Garwood, *Breast Cancer Res.*, 2005, 7, 149.
- 2 R. E. Mitchell, M. H. Katz, J. M. McKiernan and M. C. Benson, *Nat. Rev. Urol.*, 2005, 2, 356.
- 3 M. Colombo, S. Carregal-Romero, M. F. Casula, L. Gutierrez, M. P. Morales, I. B. Bohm, J. T. Heverhagen, D. Prospero and W. J. Parak, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 4306.
- 4 R. Zakaria, K. Das, M. Bhojak, M. Radon, C. Walker and M. D. Jenkinson, *Cancer Imaging*, 2014, 14, 8.
- 5 P. Mi, D. Kokuryo, H. Cabral, H. Wu, Y. Terada, T. Saga, I. Aoki, N. Nishiyama and K. Kataoka, *Nature Nanotechnol.*, 2016, 11, 724.
- 6 W. Cheng, Y. Ping, Y. Zhang, K. H. Chuang and Y. Liu, *J. Healthc. Eng.*, 2013, 4, 23.
- 7 R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1987, 87, 901.
- 8 P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2293.

- 9 M. E. Davis, Z. G. Chen and D. M. Shin, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008, 7, 771.
- 10 N. Lee and T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2575.
- 11 K. M. Hasebroock and N. J. Serkova, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2009, 5, 402.
- 12 A. Z. Khawaja, D. B. Cassidy, J. Al Shakarchi, D. G. McGrogan, N. G. Inston and R. G. Jones, *Insights Imaging*, 2015, 6, 553.
- 13 N. Lee, D. Yoo, D. Ling, M. H. Cho, T. Hyeon and J. Cheon, *Therapy, Chem. Rev.*, 2015, 115, 10637.
- 14 Z. Zhou, R. Bai, J. Munasinghe, Z. Shen, L. Nie and X. Chen, *ACS Nano*, 2017, 11, 5227.
- 15 T.-H. Shin, Y. Choi, S. Kima and J. Cheon, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 4501.
- 16 K. H. Bae, Y. B. Kim, Y. Lee, J. Hwang, H. Park and T.G. Park, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21, 505.
- 17 Y.-K. Peng, C. N. P. Lui, Y.-W. Chen, S.-W. Chou, E. Raine, P. -T. Chou, K. K. L. Yung and S. C. E. Tsang, *Chem. Mater.*, 2017, 29, 4411.
- 18 J.-S. Choi, J.-H. Lee, T.-H. Shin, H.-T. Song, E. Y. Kim and J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 11015.
- 19 T.-H. Shin, J.-S. Choi, S. Yun, I.-S. Kim, H.-T. Song, Y. Kim, K. I. Park and J. Cheon, *ACS Nano*, 2014, 8, 3393.
- 20 K. Cheng, M. Yang, C. Qin, X. Su and Z. Cheng, *ACS Nano*, 2014, 8, 9884.
- 21 Z. Zhou, D. Huang, J. Bao, Q. Chen, G. Liu, Z. Chen, X. Chen and J. A. Gao, *Adv. Mater.*, 2012, 24, 6223.
- 22 G. Huang, H. Li, J. Chen, Z. Zhao, L. Yang, X. Chi, Z. Chen, X. J. Wang and J. Gao, *Nanoscale*, 2014, 6, 10404.
- 23 M. Perrier, S. Kenouche, J. Long, K. Thangavel, J. Larionova, C. Goze-Bac, A. Lascialfari, M. Mariani, N. Baril, C. Guérin, B. Donnadieu, A. Trifonov and Y. Guari, *Inorg. Chem.*, 2013, 52, 13402.
- 24 V. S. Perera, L. D. Yang, J. Hao, G. Chen, B. O. Erokwu, C. A. Flask, P. Y. Zavalij, J. P. Basilion and S. D. Huang, *Langmuir*, 2014, 30, 12018.
- 25 X. Cai, W. Gao, M. Ma, M. Wu, L. Zhang, Y. Zheng, H. Chen and J. A. Shi, *Adv. Mater.*, 2015, 27, 6382.
- 26 L. Yang, Z. Zhou, H. Liu, C. Wu, H. Zhang, G. Huang, H. Aib and J. Gao, *Nanoscale*, 2015, 7, 6843.
- 27 P. Botella, Í. Ortega, M. Quesada, R. F. Madrigal, C. Muniesa, A. Fimia, E. Fernández and A. Corma, *Dalton Trans*, 2012, 41, 9286.
- 28 A. Cabrera-García, A. Vidal-Moya, Á. Bernabeu, J. Pacheco-Torres, E. Checa-Chavarria, E. Fernández and P. Botella, *Nanomaterials*, 2016, 6, 109.
- 29 P. Botella, A. Corma and M. Quesada, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 6394.

- 30 P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, 1986, 25, 245.
- 31 A. M. Clemments, C. Muniesa, C. Landry and P. Botella, *RSC Adv.*, 2014, 4, 29134.
- 32 A. Oyane, H.-M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 65A, 188.
- 33 S. Blüml, L. R. Schad, B. Stepanow and W. J. Lorenz, *Magn. Reson. Med.*, 1993, 30, 289.
- 34 J. Hennig and H. Friedburg, *Magn. Reson. Imaging*, 1988, 6, 391.
- 35 J. Hennig, A. Nauwerth and H. Friedburg, *Magn. Reson. Med.*, 1986, 3, 823.
- 36 M. Yamada and S. -y. Yonekura, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 21531.
- 37 M. C. Navarro, E. V. Pannunzio-Miner, S. Pagola, I. Gómez and R. E. Carbonio, *J. Solid. State Chem.*, 2005, 178, 847.
- 38 Y. Ding, X. Chu, X. Hong, P. Zou and Y. Liu, *Appl. Phys. Lett.*, 2012, 100, 013701.
- 39 P. Botella, I. Abasolo, E. Fernández, C. Muniesa, S. Miranda, M. Quesada, J. Ruiz, S. Jr. Schwartz and A. Corma, *J. Control. Release*, 2011, 156, 246.
- 40 H. B. Na, J. H. Lee, K. An, Y. I. Park, M. Park, I. S. Lee, D.-H. Nam, S. T. Kim, S.-H. Kim, S.-W. Kim, K.-H. Lim, K.-S. Kim, S.-O. Kim and T. Hyeon, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 5397.
- 41 Y. Deng, E. Li, X. Cheng, J. Zhu, S. Lu, C. Ge, H. Gu and Y. Pan, *Nanoscale* 2016, 8, 3895.
- 42 M. Bottrill, L. Kwoka, J. Nicholas and N. J. Long, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35, 557.
- 43 W. Zhang, J. Martinelli, J. A. Peters, J. M. A. van Hengst, H. Bouwmeester, E. Kramer, C. S. Bonnet, F. Szeremeta, É. Tóth and K. Djanashvili, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 23458.
- 44 Y. Li, T. Chen, W. Tan and D. R. Talham, *Langmuir*, 2014, 30, 5873.
- 45 T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, *Cell Viability Assays*. In: *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, MD, 2012.
- 46 M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and S. Laurent, *Chem. Rev.*, 2011, 111, 5610.
- 47 . Lu, M. Liong, Z. Li, J. I. Zink and F. Tamanoi, *Small*, 2010, 6, 1794.





**Artículo:** Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *Nanomaterials* 2016, 6, 109. DOI 10.3390/nano6060109

## Gd-Si Oxide Nanoparticles as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging

Alejandro Cabrera-García 1, Alejandro Vidal-Moya 1, Ángela Bernabeu 2, Jesús Pacheco-Torres 3, Elisa Checa-Chavarria 4, Eduardo Fernández 4 and Pablo Botella 1,\*

1 Instituto de Tecnología Química, Universitat Politècnica de València-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain; alcabgar@itq.upv.es (A.C.-G.); svidal@itq.upv.es (A.V.-M.)

2 Unit of Magnetic Resonance Imaging, Hospital Universitario de Alicante, INSCANNER S.L., Alicante, Spain; angela.bernabeu@gmail.com

3 Unit of Functional Magnetic Resonance Imaging, Instituto de Neurociencias (CSIC-UMH), Alicante, Spain; jpacheco@umh.es

4 Institute of Bioengineering, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain and Centre for Network Biomedical Research (CIBER-BBN), Spain; echecha@goumh.umh.es (E.C.-C.); e.fernandez@umh.es (E.F.)

\* Correspondence: pbotella@itq.upv.es; Tel.: +34-963-877-000 (ext. 78502); Fax: +34-963-879-444

Academic Editors: Eva Pellicer and Jordi Sort Viñas

Received: 29 March 2016; Accepted: 27 May 2016; Published: 8 June 2016

**Abstract:** We describe the synthesis, characterization and application as contrast agents in magnetic resonance imaging of a novel type of magnetic nanoparticle based on Gd-Si oxide, which presents high Gd<sup>3+</sup> atom density. For this purpose, we have used a Prussian Blue analogue as the sacrificial template by reacting with soluble silicate, obtaining particles with nanorod morphology and of small size (75 nm). These nanoparticles present good biocompatibility and higher longitudinal and transversal relaxivity values than commercial Gd<sup>3+</sup> solutions, which significantly improves the sensitivity of *in vivo* magnetic resonance images.

**Keywords:** Prussian Blue analogues; Gd-Si nanoparticles; magnetic resonance imaging; contrast agent

### 1. Introduction

One of the main reasons why cancer is a major medical challenge of the 21st century is that, in many cases, therapy success is mostly affected by timely diagnosis and prognosis. In this sense, it is crucial to find novel approaches of diagnostic techniques capable of detecting the malignancy at early stages. Here, magnetic resonance imaging (MRI) is a non-invasive technique in medical research that presents several advantages (use of non-ionizing radiation, widespread clinical implementation, and good anatomical resolution) that make it one of the most powerful

imaging techniques [1–3]. Contrast agents (CA) are used for multiple purposes in MRI, one of them being the clinical detection of tumors [4]. Based on their relaxation processes, CAs are classified as T1-positive agents of paramagnetic species and T2-negative agents of superparamagnetic materials. Due to their high sensitivity and detectability, Gd<sup>3+</sup>-based soluble chelates are the most representative and preferential T1 CAs in current MRI clinical applications [5]. However, their poor pharmacokinetics profile, due to quick renal filtration, limits the sensitivity [6]. This, consequently, requires the administration of generous CA doses, e.g., perfusion studies for tumor detection, which may lead to some side effects such as headache, nausea, and dizziness [7]. Among the most significant side effects reported regarding the administration of Gd<sup>3+</sup> compounds, we find nephrogenic systemic fibrosis in patients with impaired kidney function, hypersensitivity reactions, and nephrogenic fibrosing dermopathy, which makes it expedient to develop alternatives to these small, soluble molecules [8].

At this point, magnetic nanoparticles (MNP) present several advantages over conventional Gd<sup>3+</sup> CAs, such as large payloads of paramagnetic metal ions, extended plasma circulating half-lives, passive accumulation at tumor sites, and improved safety profiles [9,10]. Therefore, the incorporation of Gd<sup>3+</sup> in a stable nanocarrier points to the development of safe and efficient CAs for MRI. In this context, silica nanomaterials have been recently considered to be excellent candidates for the preparation of drug delivery systems and CAs. Firstly, their textural properties favor the loading of significant quantities of therapeutic molecules within pore channels. Secondly, it is possible to obtain nanoparticles of these materials, which results in an accurate control over pore structure, particle shape and size [11,12] and, finally, the silanol-containing surface can be easily functionalized, introducing additional features that allow imposing targeting delivery [13]. Furthermore, biocompatibility test results have shown the potential of these materials in the preparation of pharmaceutical forms that might find application in diagnostics and customized medicine [14].

The first attempt to create a silica-based Gd<sup>3+</sup> CA was by incorporation, by covalent bonding or by confinement, of a Gd<sup>3+</sup> chelate [15–23]. This way, highly paramagnetic conjugates may be obtained, in some cases with very impressive longitudinal ( $r_1$ ) and transversal ( $r_2$ ) relaxivity values. However, Gd<sup>3+</sup> concentration in these conjugates is usually low, which reduces the sensitivity for *in vivo* applications. Moreover, metal leaching in biological fluids is not always negligible, which may hinder administration of recurrent doses. More stable CAs can be prepared by doping the silica matrix with Gd<sup>3+</sup> cations [24–29], but the paramagnetic center density in the silicate network remains limited. A possibility to increase the number of metal centers per particle and to avoid toxicity issues is to protect small gadolinium nanoparticles with

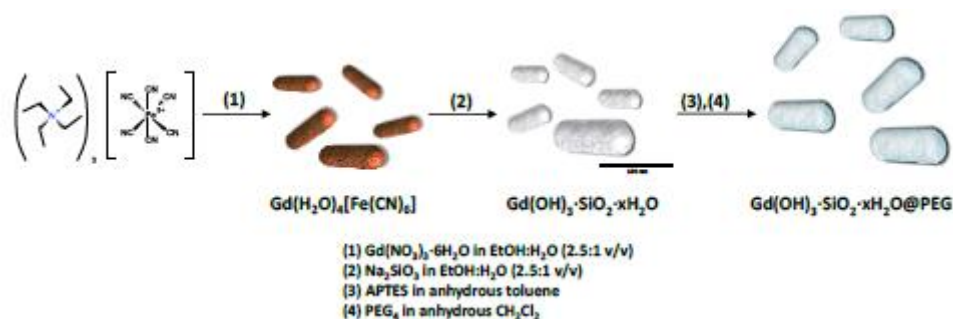
a silica shell [30–37]. These systems are very stable in physiological medium and their main drawback is the low accessibility of the  $Gd^{3+}$  sites to water molecules, due to the confining effects developed over the silica coating. It must be considered that the  $r_1$  relaxivity is highly dependent on the number of water molecules coordinating to each metal ion in the first hydration sphere ( $q$ ), which plays a detrimental role in MRI properties of these materials, especially when the present trend in clinical MRI is moving towards the use of higher magnetic field strength to obtain a better signal to noise ratio (SNR).

In order to increase the number of metal centers per particle, without reducing the water accessibility, an alternative is to develop Gd silicate-based MNP, where the high ion density and a disordered structure allow for efficient interaction of most  $Gd^{3+}$  sites with the surrounding water [35]. On this basis, we introduce here a novel approach for the synthesis of Gd-Si oxide nanoparticles with high  $Gd^{3+}$  atom density and excellent stability in physiological conditions. For this purpose, we used an optimized method developed by our group [38], wherein Prussian Blue analogue (PBA)  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$  is used as a sacrificial template by reacting with soluble silicate. By overlapping kinetics of silica condensation with  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  removal, we are able to synthesize particles of an oxide nanocomposite with equal shape and size than former PBA crystallites. The resulting material presents nanorod morphology, small particle size (75 nm average length), and shows good  $r_1$  and  $r_2$  relaxivity values in a 3 tesla (T) magnetic field, improving positive contrast of *in vitro* and *in vivo* MRI images.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Materials Preparation and Characterization

Scheme 1 depicts the strategy to synthesize pre-formed Gd-Si oxide nanoparticles. Firstly, an improved method for the preparation of GdFe PBA with small particle size was developed.



Scheme 1. Synthesis layout of Gd-Si oxide nanorods using  $Gd(H_2O)_4[Fe(CN)_6]$  as a sacrificial template.

Rod-shaped, monodispersed, high-purity particles of 94 nm average diameter were obtained (see Table 1). The crystal structure of the tridimensional coordination network

Gd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] has been recently solved [39]. The solid crystallizes in the orthorhombic system with C<sub>mcm</sub> space group and cell parameter of a = 7.4016(3) Å, b = 12.78813 (16) Å, and c = 13.5980(12) Å. This nanosized MOF presents a fully comparable powder X-ray diffraction (XRD) pattern to that obtained for the bulk compound (Figure 1). Moreover, crystal composition, as determined by energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis (EDS) analysis, is very homogeneous, with uniform Fe and Gd distribution within the particles, as revealed by elemental mapping results (Figure 2), which is strongly consistent with the stoichiometry of the metal-organic framework (MOF).

Table 1. Compositional and textural characteristics of as-synthesized materials

| Sample | Molecular Formula   | Atomic Composition (%) <sup>a</sup> |      |      | Size (nm)        |                  | Area BET (m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> |
|--------|---|-------------------------------------|------|------|------------------|------------------|--|
|        |   | Gd                                  | Fe   | Si   | TEM <sup>c</sup> | DLS <sup>d</sup> |  |
| GdFe   | Gd(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]  | 52.8                                | 47.2 | –    | 94.2 ± 35.5      | nd <sup>e</sup>  | nd <sup>e</sup>  |
| GdSi   | Gd(OH) <sub>3</sub> ·3SiO <sub>2</sub> ·xH <sub>2</sub> O | 18.6                                | 1.3  | 80.1 | 75.2 ± 24.0      | 84 ± 44          | 19.0   |

<sup>a</sup> As determined from the energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis (EDS) study; <sup>b</sup> Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area analysis; <sup>c</sup> Avg ± SD, as determined by transmission electron microscopy (TEM) measurement of at least 200 particles; <sup>d</sup> Diffuse light scattering (DLS); <sup>e</sup> nd = not determined.

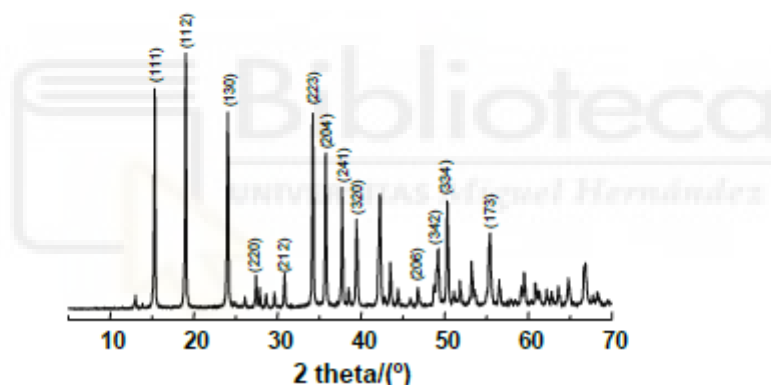


Figure 1. Powder X-ray diffraction (XRD) pattern of as-made GdFe nanorods

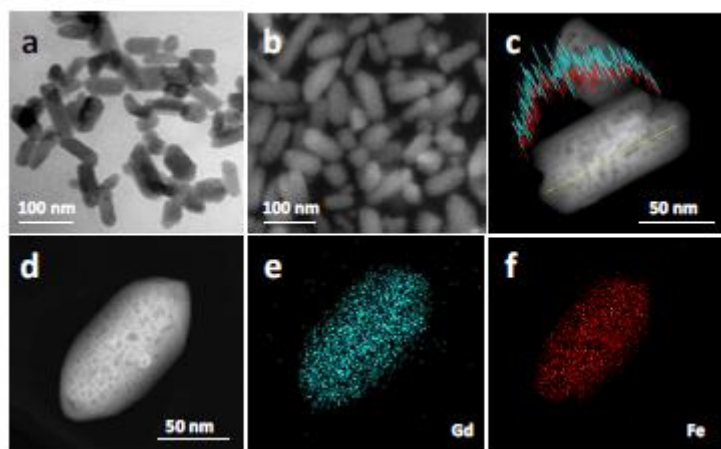
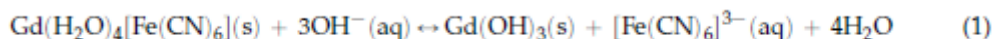
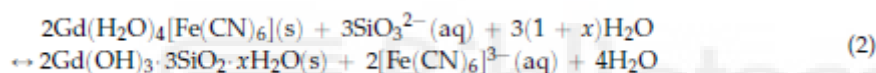


Figure 2. Electron microscopy study of as synthesized GdFe nanorods. (a,b): Transmission electron microscopy (TEM) (a) and field-emission scanning electronic microscopy (FESEM) (b) images; (c) Scanning transmission electron microscopy (STEM) image with energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis (EDS) line scans. Legend: blue line = Gd; red line = Fe; (d,f): STEM image (d) and EDS mapping pictures of one GdFe nanorod (e,f).

Such GdFe small crystallites are partially soluble in neutral water, and an ion exchange reaction takes place in alkaline solution resulting in complete MOF dissolution, as follows Equation (1):



This reaction can be carried out in the presence of silicate ions, the hydrolysis of which provides enough  $\text{OH}^-$  concentration for the transformation. Therefore, under optimized conditions, it is possible to overlap ion exchange of the PBA with the hydrolysis of the conjugate base, and, as a consequence, a simultaneous and stoichiometric condensation of gadolinium hydroxide and silica takes place. This process is defined by Equation (2):



Dense, monodispersed Gd-Si oxide nanoparticles (GdSi) are obtained mostly preserving the original rod shape and size of the sacrificial GdFe crystals. The reaction proceeds slowly at room temperature in a silicate solution (EtOH:H<sub>2</sub>O, 2.5:1 v/v). This way, MOF particles are gradually consumed, releasing  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  as hydroxide ions diffuse inward, and a composite of  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  and  $\text{SiO}_2$  is formed. The powder XRD pattern shows an amorphous material (figure not shown), with BET surface area of about  $19.0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  and low porosity (Table 1). This nanohybrid low crystallinity is due to mutual inhibition of crystal growth between the highly-dispersed  $\text{Gd}(\text{OH})_3$  and  $\text{SiO}_2$  [40].

Electron microscopy study by TEM and FESEM (Figure 3) confirms that morphology does not experience significant changes, although nanosized rods present a slightly smaller average diameter (75 nm). As already detected with other morphologies at the nanoscale [38], our transformed particles are fully dense, what contrasts with observations by Lou and co-workers over Prussian Blue microbox derivatives [40,41]. We attribute such different material features to the nanoscale, as the inward  $\text{OH}^-$  ion diffusion is faster in smaller particles and  $2\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  moiety precipitates quickly to refill the empty space left by released  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  species. EDS analysis is consistent with the expected stoichiometry (Gd:Si atomic ratio of about 2:3), and demonstrates almost complete iron removal (Table 1). Moreover, the spatial distribution of

Gd(OH)<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> in isolated particles can be clearly seen by elemental mapping (Figure 3c–h), which illustrates both the homogeneous distribution of Gd and Si, and iron extraction.

The GdSi sample presents a good stability pattern for use in biological medium. In this context, the hydrodynamic diameter, as determined by diffuse light scattering (DLS) (Figure 4), is 83.9 ± 44.1 nm, is very close to that determined by TEM, and with a narrow size distribution, which indicates that most of the particles are monodispersed. Furthermore, dissolution tests carried out for 24 h in phosphate buffer saline (PBS) and in an isotonic glucose aqueous solution revealed no detectable leaching of Gd<sup>3+</sup> and/or Si<sup>4+</sup> cations in the incubation medium.

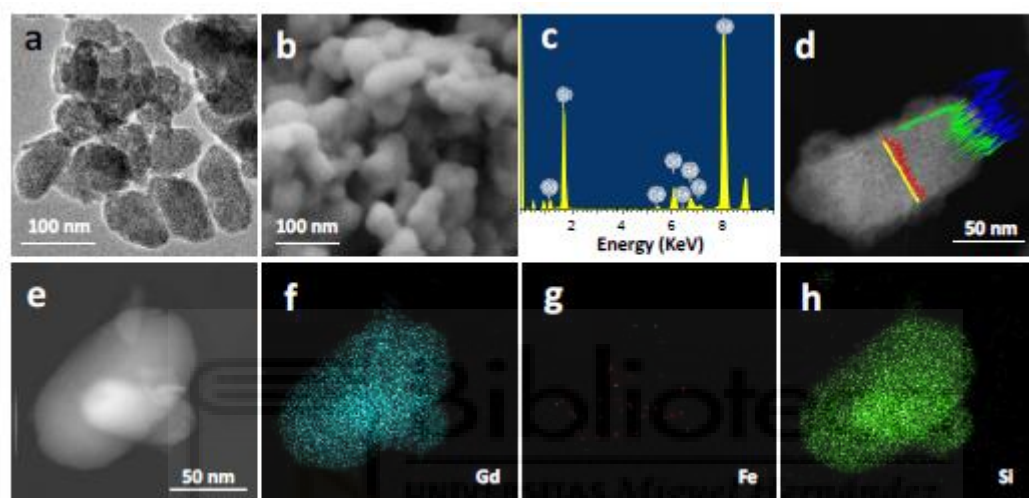


Figure 3. Electron microscopy study of GdSi nanorods obtained by alkaline transformation of GdFe precursor. (a,b): TEM (a) and FESEM (b) images of GdSi nanoparticles; (c) EDS elemental analysis; (d) STEM image with EDS line scans. Legend: blue line = Gd; red line = Fe; green line = Si; (e–h) STEM image (e) and EDS mapping pictures of two GdSi nanorods (f–h).

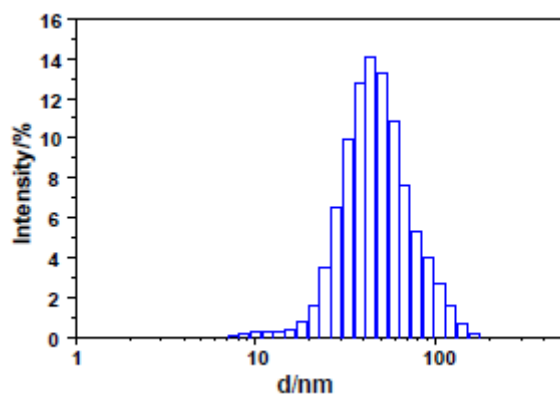


Figure 4. Particle hydrodynamic diameter of GdSi sample as determined in water by DLS.

## 2.2. Relaxivity Measurements and *In Vitro* MRI

The efficacy of GdSi as T1- or T2-weighted CA for MRI was evaluated by measuring the longitudinal ( $r_1$ ) and transversal ( $r_2$ ) nuclear magnetic relaxation rates of water protons in aqueous suspensions at 3 T and room temperature. Stable colloids were prepared in aqueous xanthan gum (0.1%) solution with  $Gd^{3+}$  concentration in the range 0–1.00 mM. Relaxivity values were determined by using the following expression [42]:

$$\frac{1}{T_i(w)} = \frac{1}{T_{i(0)}} + r_i \quad (3)$$

Where  $i = 1$  or  $2$  values, respectively, for longitudinal or transversal-weighted effect of CA.  $1/T_{i(w)}$  is the global relaxation rate constant of bulk water molecules,  $T_{i(0)}$  is the water relaxation time without contrast agents (CA), and  $C$  is the paramagnetic ion concentration. Therefore,  $r_1$  and  $r_2$  values were determined, respectively, from the plot slopes of  $1/T_1$  ( $s^{-1}$ ) and  $1/T_2$  ( $s^{-1}$ ) versus  $Gd^{3+}$  concentration (mM, Table 2 and Figure 5). For the sake of comparison, same measurements were carried out with commercial CA gadopentetate dihydrogen salt (Gd-DTPA, Aldrich). CAs can be classified according to their T1 or T2 lowering activity. Moreover, when  $r_2/r_1$  value is close to 1, application as a positive (bright) CA is favored, whereas if this ratio increases far from 1 the CA works better for negative (dark) contrast [43].

| Sample  | $r_1/s^{-1} \cdot mM^{-1}$ | $r_2/s^{-1} \cdot mM^{-1}$ | $r_2/r_1$ |
|---------|----------------------------|----------------------------|-----------|
| GdSi    | 5.6                        | 8.2                        | 1.4       |
| Gd-DTPA | 4.1                        | 3.3                        | 0.8       |

Table 2. Relaxivity properties for sample GdSi sample and commercial gadopentetate dihydrogen salt (Gd-DTPA).

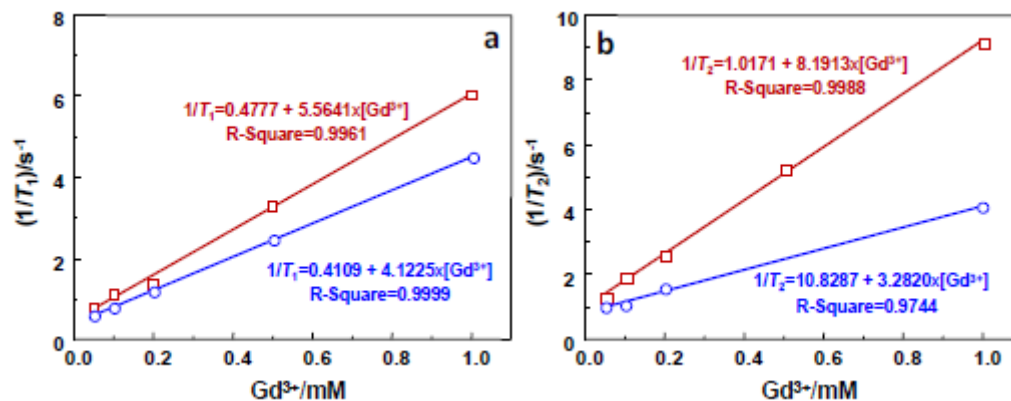


Figure 5. T<sub>1</sub> (a) and T<sub>2</sub> (b) relaxation rate measurements vs concentration of GdSi aqueous solutions (0.1% xanthan gum) at a magnetic field of 3 T. Legend: (□) GdSi; (◊) Gd-DTPA.

As it can be seen in Table 2, GdSi sample shows longitudinal and transversal relaxivity values, respectively, 1.4 and 2.5 times higher than those corresponding to the soluble  $\text{Gd}^{3+}$  complex. This is in agreement with other authors' observations for different Gd silicate nanoparticles [37]. At this point, the high Gd concentration (320 mg/g) present in this material should be considered. With regards to the mononuclear  $\text{Gd}^{3+}$  complex, such a large density of paramagnetic centers in the nanoparticle shortens T1 and T2 scores due to a cooperative effect and accessibility of all  $\text{Gd}^{3+}$  centers (surface and core) [39]. Therefore, it is noticeable that no diffusion restrictions are present between water molecules and  $\text{Gd}^{3+}$  sites located in the silicate matrix. Additionally, it must be taken into account that the presence of a small  $\text{Fe}^{3+}$  quantity in the as-synthesized GdSi sample (Table 1) might contribute to a reduced T2 value. In this sense, with a  $r_2/r_1$  ratio of about 1.5, this material is expected to improve MRI images mostly in positive contrast. To further check the capability of the GdSi nanomaterial, we collected phantom MRI images (Figure 6). The phantom was scanned with a single slice in coronal orientation with variable CA or gadopentetate concentration. Results show that T1 images become progressively brighter as nanoparticle content increases (Figure 6a,b). Furthermore, T2-weighted images become darker with  $\text{Gd}^{3+}$  concentration, but with lower significance than the positive contrast (Figure 6c). In all cases, the sensitivity of this system is higher than that of the commercial  $\text{Gd}^{3+}$  chelate. This encouraged us to test these MNPs in biological conditions, as described in the next two sections.

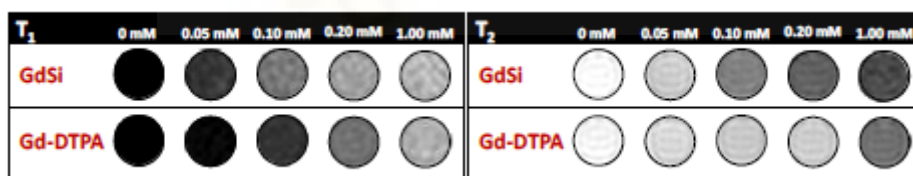


Figure 6. T1-weighted (left) and T2-weighted (right) magnetic resonance imaging (MRI) slices of GdSi aqueous solutions (0.1% xanthan gum), with varying  $\text{Gd}^{3+}$  concentration, at magnetic field of 3 T and echo time of 2 ms (T1) and 203 ms (T2).

### 2.3. Cytotoxicity Test

In order to validate the potential performance of the Gd-Si nanoparticles in a biological environment, cell viability was assessed 24 h after incubation with the GdSi sample by measuring the conversion of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to its formazan form following standard procedures. For these experiments we used healthy fibroblasts (3T3 cell line) and several cancer cell lines (HeLa cells, 42-MG-BA glioblastoma multiforme cells and SH-SY5Y neuroblastoma cells) at a range of concentrations (0.25–100  $\mu\text{g}$  ·



mL<sup>-1</sup>). Results (Figure 7) indicate that cell survival was always of about 70% or higher, even at maximum particle concentration. Despite MTT assay limitations for accurate cell viability determination, these results correspond to an acceptable biocompatibility profile.

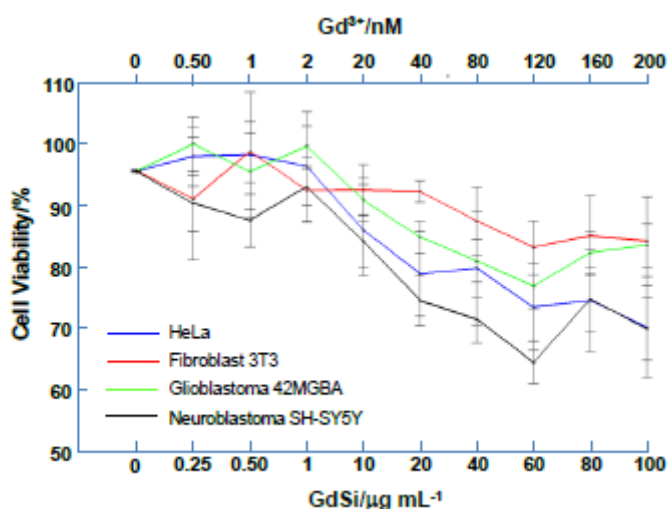


Figure 7. *In vitro* 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell viability assays in different cell lines incubated with variable concentrations of GdSi magnetic nanorods (mean $\pm$  SEM, n = 4). Top X-axis indicates the concentration of equivalent Gd<sup>3+</sup>.

#### 2.4. *In Vivo* MRI Studies Imaging

It is well known that when introducing non-protected nanoparticles in blood, these suffer from strong protein adsorption, resulting in protein corona formation, which promotes further interaction with cell elements of the reticuloendothelial system (RES) [44]. As a consequence, particles are rapidly cleared from blood and accumulated in RES tissues, mainly the liver, spleen and lungs. Consequently, for the *in vivo* study of GdSi contrast material, we firstly modified nanorod surfaces with a short polyethyleneglycol (PEG) chain, according to a recipe developed by our group [45]. This way, nanoparticles are expected to prolong circulation in the blood stream, finally being removed from the body mostly by renal (urine) and hepatic (biliary) routes [46,47]. Then, 1.0 mL of a 5 mg·mL<sup>-1</sup> GdSi<sub>PEG</sub> stable colloid in glucose 5.5% was perfused into the catheterized tail vein of healthy male Sprague-Dawley rats as a bolus (0.04 mmol Gd kg<sup>-1</sup>). Subsequently, T1- and T2-weighted images were acquired before (baseline) and after the administration of the CA by using a 7 T horizontal scanner. Figure 8 shows coronal T1-weighted images depicting kidneys (Figure 8a,b, red arrows) and liver (Figure 8c,d, red arrows), respectively, before (Figure 8a,c) and after (Figure 8b,d) CA administration. These organs receive most of the blood stream showing highly significant particle accumulation, which promotes a noticeable MRI T1 contrast enhancement. Kidneys showed a 7% increase in the MRI signal

intensity (SI) after the CA administration. Liver presented non-homogenous changes, probably due to restricted nanoparticle biodistribution and pharmacokinetics, with some areas depicting large changes up to 21% (Figure 8c,d, arrowhead), whereas other areas showed no changes or even a decrease in SI. The contrast enhancement in the liver stands for at least one hour, the time we followed the contrast agent by MRI. We can hypothesize that contrast will be enhanced for longer because when we stopped the acquisition we were still able to detect a signal intensity enhancement with respect to baseline.

We are aware that similar MRI T1 contrast increase has also been recently reported with other paramagnetic nanoparticles [48,49]. However, the GdSi system shows improved stability and a superior safety profile in biological fluids, as no cation leaching was observed in dissolution tests carried out for 24 h. Moreover, although this is not the aim of this work, in the case of application to tumor development study, GdSi nanoparticle delivery to cancer cells may be promoted by surface incorporation of specific moieties that target upregulated peptides in rapidly-dividing cells [50].

Conversely, despite the good MRI *in vitro* results formerly presented for T1, we must say that no significant change was observed in T2 weighted images following CA administration.

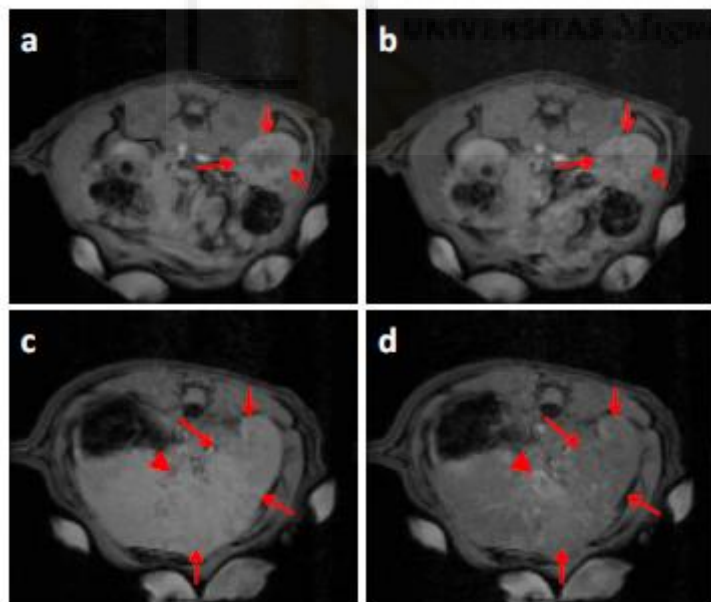


Figure 8. *In vivo* coronal T1-weighted images acquired from a male Sprague-Dawley rat at 7 T magnetic field. (a,c) Control (baseline) with no MNP administration; (b,d) Acquisition 30 min after GdSi nanoparticles injection ( $0.04 \text{ mmol Gd}^{3+} \text{ kg}^{-1}$ ); Red lines show up kidneys (a,b) and liver (c,d).

### 3. Experimental Section

### 3.1. Materials

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), except  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ABCR, Karlsruhe, Germany) and HPLC grade solvents (Scharlab, Barcelona, Spain). Gd-Si oxide nanoparticles protected with a PEG external coating were synthesized in a three-step process (Figure 1).

HeLa cell line, D6-3T3 (fibroblasts cells), 42-MG-BA (glioblastoma multiforme cells), and SH-SY5Y (neuroblastoma cells), were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. Reagents used for cells growth were MEM Eagle, RPMI Medium 1640, DMEM, and Ham (F12) Nut MIX (Gibco BRL-Life Technologies, CA, USA) fetalbovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin solution (Pen-Strep). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Male Sprague-Dawley rats (250–300 g) (three specimens) were acquired from Janvier Labs (France) and maintained under a 12/12-h light/dark cycle (lights on 07:00–19:00 h) at room temperature (22 ± 2°C), with free access to food and water. Rats were housed in group and adapted to these conditions for at least one week before experimental manipulation. All experiments were approved by the local authorities (CSIC-UMH) and were performed in accordance with Spanish (law 32/2007) and European regulations (EU directive 86/609, EU decree 2001-486).

### 3.2. Synthesis of $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Firstly, we prepared the  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  precursor following a known recipe [51]. Briefly, 3.3 g (10 mmol) of  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  and 6.3 g (30 mmol) of  $\text{Et}_4\text{NBr}$  were dissolved with 200 mL of methanol in a 500 mL flask connected to a nitrogen line, and stirred at 30°C for three days under  $\text{N}_2$  atmosphere. The mixture was filtered off and the filtrate was concentrated to approximately 10 mL by rotary evaporation. The resulting solution was stirred with 100 mL of ethyl ether and the yellow precipitate was collected by filtration. The crude was dissolved in 150 mL of refluxing acetonitrile and the solution was allowed to cool, obtaining  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . For nanosized Prussian Blue analogue preparation,  $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.86 g, 2.5 mmol) were dissolved in 50 mL of  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  (2.5:1 v/v). Then, a solution of the previously-synthesized  $(\text{Et}_4\text{N})_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1.5 g, 2.5 mmol, in 15 mL methanol) was added and the mixture was left for a day at room temperature. The precipitate was filtered off, washed with ethanol, and vacuum dried to yield 118 mg of an orange powder (GdFe).

### 3.3. Synthesis of GdSi Oxide/hydroxide Nanocomposite

Dense,  $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  nanoparticles (GdSi) were prepared by modification of a previously reported method [40,41].  $\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (550 mg, 1.25 mmol), was suspended in 278 mL of EtOH:H<sub>2</sub>O (2.5:1 v/v) with vigorous stirring. Then, 3-cyanopropyltrichlorosilane (697  $\mu\text{L}$ , 4.50 mmol) was added and, after 30 min, 3.5 mL ammonia solution and 11 mL of sodium silicate solution (0.54% SiO<sub>2</sub>, 2.69 mmol) were introduced. The reaction was allowed to proceed for 48 h. Non-reacted silicate ions were removed by subsequent centrifugation (484 g, 2 h), and the obtained white solid was washed repeatedly with milliQ water, centrifuged again (1935 g, 30 min), and further freeze dried (-55 °C, 16 h).

In order to modify the GdSi surface, we used a method previously described by our group [45]. 375 mg of  $\text{Gd}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  was dried at 80°C and vacuum (8 torr) for 24 h. Afterwards, 7.4 mL of anhydrous toluene was added and the mixture was heated to reflux. Then, 728  $\mu\text{L}$  (3.13mmol) of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) was added and the mixture was stirred for 3 h. The obtained product was filtered off, washed with toluene and methanol and freeze-dried (-55 °C, 16 h). Next, 156 mg of the above material was suspended in 15.6 mL of anhydrous dichlorometane. Then, 195  $\mu\text{L}$  of diisopropyl amine were injected under nitrogen atmosphere. Afterwards, 234 mg of 2,5,8,11-tetraoxatetradecan-14-oic acid succinimidyl ester (PEG<sub>4</sub>) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature. Later, the solvent was removed under reduced pressure and the nanoparticles were suspended in 100 mL of ethanol with stirring. Subsequently, the suspension was filtered off and washed with ethanol (300 mL). Finally, the material ( $\text{GdSi}_{\text{PEG}}$ ) was freeze-dried (-55 °C, 16 h).

### 3.4. Materials Characterization

Powder X-ray diffraction (XRD) patterns were collected in a Philips X'Pert diffractometer equipped with a graphite monochromator, operating at 40 kV and 45 mA and using nickel-filtered Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.1542$  nm). Liquid nitrogen adsorption isotherms of 200 mg of sample were measured in a Micromeritics Flowsorb apparatus. Surface area calculations were done by the BET method. Samples for transmission electron microscopy (TEM) were ultrasonically dispersed in a mixture of EtOH:H<sub>2</sub>O (2.5:1 v/v) and transferred to carbon-coated copper grids. TEM and scanning transmission electron microscopy (STEM) micrographs were collected in a JEOL JEM 2100F microscope operating at 200 kV. The quantitative energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis (EDS) was performed in an INCA Energy TEM 250 system from Oxford Instruments, working with a SDD X-MAX 80 detector. Field-emission scanning electron microscopy (FESEM) micrographs were collected in a ZEISS Ultra 55 microscope

operating at 2 kV, with a  $2 \cdot 10^{-9}$  A beam current and 2.5 mm as the working distance. Infrared spectra were recorded at room temperature in the  $400\text{-}3900\text{ cm}^{-1}$  region with a Nicolet 205xB spectrophotometer, equipped with a Data Station, at a spectral resolution of  $1\text{ cm}^{-1}$  and accumulations of 128 scans. Samples were outgassed at  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$  under vacuum during 1 h for complete water removal before acquisition. Finally, water and organic (PEG<sub>3</sub>) content were calculated from elemental analysis (FISONS, EA 1108 CHNS-O) and thermogravimetric (TGA) measurements (Mettler-Toledo TGA/SDTA851<sub>e</sub>).

### 3.5. Stability Assays

GdSi<sub>PEG</sub> material stability in physiological medium was monitored by solution assay in phosphate-buffered saline (PBS, 1X) or glucose aqueous solution (5.5 wt. %). 5 mg of the corresponding material were stirred in 1 mL at 1500 rpm and  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a Thermomixer® for 24 h. Then, samples were centrifuged (16,100 g, 15 min) and supernatant metal cation concentration was analyzed by inductively coupled plasma (ICP).

### 3.6. Cell Biocompatibility

The different cell lines were cultured in 96-well cell culture plates with the seeding densities shown below in a final medium volume of 200  $\mu\text{L}$ /well: HeLa 10,000 cells/mL; fibroblast 3T3 and glioblastoma 42-MGBA 50,000 cells/mL and neuroblastoma SH-SY5Y 100,000 cells/mL. HeLa cells were grown in MEM (Earle's), 3T3 cell line in DMEM, 42-MGBA cell line in MEM (Earle's) and RPMI 1640 (1:1), and SH-SY5Y cell line was cultured in a DMEM and Ham (F12) Nut MIX (1:1). Cell media were supplemented with 10% FBS and Pen-Strep 1:100 (v/v). The plates were cultured 24 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 5% CO<sub>2</sub> injection in air. After 24 h cells were treated with the CA at a concentration range of about 0.25–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in RPMI medium. Cells with nanoparticles were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h and 5% CO<sub>2</sub>. All concentrations were tested in triplicate and negative controls with no nanoparticles were also carried out.

Cell viability was measured using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, 200  $\mu\text{L}$ /well of MTT/PBS (1 mg/mL) were added and the plates were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 h. Formazan crystals were dissolved with 100  $\mu\text{L}$  DMSO and then absorbance at 595 nm was measured with a 1681130 iMark™ Microplate Reader. Absorbance values were normalized with respect to the control and expressed in percentage using the next Equation (4):

$$\text{Relative cell viability} = \frac{OD_{595\text{ TEST SAMPLE}}}{OD_{595\text{ CONTROL}}} \times 100 \quad (4)$$

Data statistical analysis was performed applying arithmetic's means and error bars of statistical error means (SEM) using MATLAB (MathWorks).

### 3.7. $^1\text{H}$ NMR Relaxometry Study and *In Vitro* MRI.

Relaxivity determinations and MRI studies were carried out in a clinical 3 T MRI unit (Philips Achieva 3 T X-Series; Philips Healthcare, The Netherlands) with an eight-channel phased array head coil. The phantom was scanned with a single slice in the coronal orientation, obtaining a transversal view of all tubes filled with variable CA concentration. Geometric parameters remain equivalent between the T2 and T1 estimation sequences (field of view  $220 \times 220 \text{ mm}^2$ , slice thickness 5 mm and  $1.0 \times 1.0 \text{ mm}^2$  in plane resolution) sharing the same spatial localization. A multi-echo spin echo sequence was used to estimate T2 values acquiring 32 echoes ranging from 14 to 231 ms ( $\Delta\text{TE} = 7 \text{ ms}$ ) with a sequence TR of 2000 ms. T1 values of each tube were estimated using a look-locker inversion recovery acquisition with 107 inversion times ranging from 6.51–5306.51 ms, with an inversion time interval of 50 ms. A new inversion pulse was applied every 6 s to avoid signal saturation due to extremely close inversion pulses. To reduce the influence of readout excitation pulse in the final T1 values, an excitation flip angle of  $5^\circ$  was applied during the TFE shot [47]. With regards to image analysis, T2 maps were generated by nonlinear fitting of the signal acquired at every  $TE$  to a mono-exponential model. The same procedure was applied to every image pixel producing T2 maps. Moreover, T1 maps were generated by nonlinear fitting of the signal acquired at every inversion time to the signal model described at [52]. As in the case of T2 maps, the same procedure was applied to every image pixel to generate the final T1 map. Quantitative values were obtained in aqueous xanthan gum (0.1%) nanoparticle suspensions by manual region of interest (ROI) analysis over T2 and T1 maps. A circular ROI was placed for each tube, avoiding the border. In each ROI, means and standard deviations were computed for further comparison. The resulting T1 and T2 values were averaged and plotted as  $1/T_i \text{ (s}^{-1}\text{)}$  where  $i = 1, 2$  versus  $[\text{Gd}^{3+}] \text{ (mM)}$ , the slopes of these graphs provided the specific relaxivities  $r_1$  and  $r_2$ .

### 3.8. *In Vivo* MRI Studies Imaging

Rats were anesthetized in an induction chamber with 3%–4% isoflurane in medical air (0.8–1 L/min) and maintained with 1%–2% isoflurane (IsoFlo) during the MRI experiment. Anesthetized animals were taped down in a custom-made animal holder to minimize breathing-related movement artifacts. The body temperature was kept at  $37^\circ\text{C}$  using a water blanket and animals were monitored using a MRI-compatible temperature control unit (MultiSens Signal conditioner, OpSens, Quebec, Canada). The breathing rate was also measured using a custom

designed device. Experiments were carried out in a horizontal 7 T scanner with a 30 cm diameter bore (Biospec 70/30v, Bruker Medical, Ettlingen, Germany). The system had a 675 mT/m actively-shielded gradient coil (Bruker, BGA 12-S) of 11.4 cm inner diameter. A  $^1\text{H}$  rat body receive-transmitter resonator (Bruker BioSpin MRI GmbH, Germany) was employed. Data were acquired with a Hewlett-Packard console running Paravision software (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Germany) operating on a Linux platform.

Studies were performed by injecting 1 mL of the CA suspension ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) into the catheterized tail vein as a single bolus ( $0.04 \text{ mmol Gd/kg}$  body weight), and acquiring images 30 min afterwards. Acquisition was held for 1 h. T2-weighted anatomical images to position the animal were collected in the three orthogonal orientations using a rapid acquisition relaxation enhanced sequence (RARE), applying the following parameters: field of view (FOV)  $40 \times 40 \text{ mm}$ , 15 slices, slice thickness 1 mm, matrix  $256 \times 256$ , effective echo time ( $\text{TE}_{\text{eff}}$ ) = 56 ms, repetition time ( $TR$ ) = 2 s, 1 average and a total acquisition time of 64 s [53,54]. Two types of images were used to assess the effect of CA in the signal intensity in T1- and T2-weighted images. For the former, FLASH images were acquired with the following parameters: 25 slices, 1.5 mm slice thickness,  $TR = 197 \text{ ms}$ ;  $TE = 2.7 \text{ ms}$ ; FOV =  $6.0 \times 5.0 \text{ cm}$ ; Mtx =  $128 \times 108$ ; averages = 4; total acquisition time = 90 s. Three images were acquired before the CA administration (baseline) and 20 after it. For the T2-weighted images, RARE was used with the same geometry than the T1-weighted images and the following parameters:  $TR = 2800 \text{ ms}$ ;  $TE = 48 \text{ ms}$ ; FOV =  $6.0 \times 5.0 \text{ cm}$ ; Mtx =  $256 \times 214$ ; averages = 8; total acquisition time = 600 s. One of these images was acquired at the beginning (baseline) and one at the end of the experiment. Data were analyzed with Image J (W. S. Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### 4. Conclusions

Gd-Si oxide nanoparticles obtained by alkaline transformation of a Prussian Blue analogue are a novel MRI contrast agent with higher longitudinal and transversal *in vitro* relaxivity values than commercial  $\text{Gd}^{3+}$  chelate solutions, excellent stability in physiological fluids, no significant cytotoxicity, and easy surface functionalization. These properties prove their potential as a valid alternative to the current CA systems used at the clinical stage, mostly in those cases where the poor pharmacokinetics profile and potential toxicity of  $\text{Gd}^{3+}$  soluble forms can become an issue (e.g., patients with renal failure). In this context, future studies will be focused on long-term *in vivo* stability and potential toxicity of this novel paramagnetic nanocomposite.

**Acknowledgments:** The authors thank the Spanish MINECO (projects MAT2012-39290-CO2-01 and MAT2012-39290-CO2-02) for financial support. A.C.-G. also thanks “La Caixa” Foundation for a Ph.D.

scholarship. We fully appreciate the assistance of the Electron Microscopy Service of the UPV and INSCANNER S.L.

**Author Contributions:** P.B. and E.F. conceived and designed the experiments. A.C.-G. synthesized and characterized the different contrast agent samples. A.V.-M., A.B. and J.P.-T. performed *in vitro* and *in vivo* MRI experiments. E.C.-C. carried out the cytocompatibility study and supervised animals for the *in vivo* study. A.C.-G. and P.B. prepared the graphic and art work. Finally, A.B., J.P.-T., E.F. and P.B. co-wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bolan, P.J.; Nelson, M.T.; Yee, D.; Garwood, M. Imaging in breast cancer: Magnetic resonance spectroscopy. *Breast Cancer Res.* 2005, 7, 149–152.
2. Mitchell, R.E.; Katz, M.H.; McKiernan, J.M.; Benson, M.C. The evaluation and staging of clinically localized prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2005, 2, 356–357.
3. Zakaria, R.; Das, K.; Bhojak, M.; Radon, M.; Walker, C.; Jenkinson, M.D. The role of magnetic resonance imaging in the management of brain metastases: diagnosis to prognosis. *Cancer Imaging* 2014, 14.
4. Cheng, W.; Ping, Y.; Zhang, Y.; Chuang, K.H.; Liu, Y. Magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents for tumor diagnosis. *J. Healthc. Eng.* 2013, 4, 23–45.
5. Hu, F.; Joshi, H.M.; Dravid, V.P.; Meade, T.J. High-performance nanostructured MR contrast probes. *Nanoscale* 2010, 2, 1884–1891.
6. Davis, M.E.; Chen, Z.G.; Shin, D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2008, 7, 771–782.
7. Lee, N.; Hyeon, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2575–2589.
8. Hasebroock, Kendra M.; Serkova, Natalie J. Toxicity of MRI and CT contrast agents. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2009, 5.
9. Corot, C.; Robert, P.; Ballet, S.; Gonzalez, W.; Idee, J.-M.; Raynal, I.; Port, M. T1-weighted MR contrast agents for cancer research. In *Molecular Imaging Probes for Cancer Research*; Chen, X., Ed.; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, 2012; pp. 611–658.
10. Sun, C.; Lee, J.S.; Zhang, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 60, 1252–1265.
11. Trewyn, B.G.; Whitman, C.M.; Lin, V.S.-Y. Morphological control of room-temperature ionic liquid templated mesoporous silica nanoparticles for controlled release of antibacterial agents. *Nano Lett.* 2004, 4, 2139–2143.
12. Gao, F.; Botella, P.; Corma, A.; Blesa, J.; Dong, L. Monodispersed mesoporous silica nanoparticles with very large pores for enhanced adsorption and release of DNA. *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, 1796–1804.



13. Vivero-Escoto, J.L.; Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery. *Small* 2010, 6, 1952–1967.
14. Tarn, D.; Ashley, C.E.; Xue, M.; Carnes, E.C.; Zink, J.I.; Brinker, J. Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers: biofunctionality and biocompatibility. *Acc. Chem. Res.* 2013, 46, 792–801.
15. Karimdjy, M.M.; Tallec, G.; Fries, P.H.; Imbert, D.; Mazzanti, M. Confinement of a tris-aqua Gd(III) complex in silica nanoparticles leads to high stability and high relaxivity and suppresses anion binding. 2015, 51, 6836–6838.
16. Huang, X.; Zhang, F.; Lee, S.; Swierczewska, M.; Kiesewetter, D.O.; Lang, L.; Zhang, G.; Zhu, L.; Gao, H.; Choi, H.S.; et al. Long-term multimodal imaging of tumor draining sentinel lymph nodes using mesoporous silica-based nanoprobe. *Biomaterials* 2012, 33, 4370–4378.
17. Davis, J.J.; Huang, W.-Y.; Davies, G.-L. Location-tuned relaxivity in Gd-doped mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 22848–22850.
18. Vivero-Escoto, J.L.; Taylor-Pashow, K.M.L.; Huxford, R.C.; Rocca, J.D.; Okoruwa, C.; An, H.; Lin, W.; Lin, W. Multifunctional mesoporous silica nanospheres with cleavable Gd(III) chelates as MRI contrast agents: synthesis, characterization, target-specificity, and renal clearance. *Small* 2011, 7, 3519–3528.
19. Pinho, S.L.; Faneca, H.G.; Geraldès, C.F.; Delville, M.H.; Carlos, L.D.; Rocha, J. Lanthanide-DTPA grafted silica nanoparticles as bimodal-imaging contrast agents. *Biomaterials* 2012, 33, 925–935.
20. Kim, J.S.; Rieter, W.J.; Taylor, K.M.L.; An, H.; Lin, W.; Lin, W. Self-assembled hybrid nanoparticles for cancer-specific multimodal imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 8962–8963.
21. Rieter, W.J.; Kim, J.S.; Taylor, K.M.L.; An, H.; Lin, W.; Tarrant, T.; Lin, W. Hybrid silica nanoparticles for multimodal imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 3680–3682.
22. Voisin, P.; Ribot, E.J.; Miraux, S.; Bouzier-Sore, A.-K.; Lahitte, J.-F.; Bouchaud, V.; Mornet, S.; Thiaudière, E.; Franconi, J.-M.; Raison, L.; et al. Use of lanthanide-grafted inorganic nanoparticles as effective contrast agents for cellular uptake imaging. *Bioconjug. Chem.* 2007, 18, 1053–1063.
23. Taylor, K.M.L.; Kim, J.S.; Rieter, W.J.; An, H.; Lin, W.; Lin, W. Mesoporous silica nanospheres as highly efficient MRI contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 2154–2155.
24. Guillet-Nicolas, R.; Bridot, J.L.; Seo, Y.; Fortin, M.-A.; Kleitz, F. Enhanced relaxometric properties of MRI “positive” contrast agents confined in three-dimensional cubic mesoporous silica nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* 2011, 21, 4653–4662.
25. Karaman, D.S.; Desai, D.; Zhang, J.; Tadayon, S.; Unal, G.; Teuho, J.; Sarfraz, J.; Smått, J.-H.; Gu, H.; Näreoja, T.; et al. Modulation of the structural properties of mesoporous silica nanoparticles to enhance the T1-weighted MR imaging capability. *J. Mater. Chem. B* 2016, 4, 1720–1732.
26. Chana, M.-H.; Lin, H.-M. Preparation and identification of multifunctional mesoporous silica nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* dual-mode imaging, theranostics, and targeted tracking. *Biomaterials* 2015, 46, 149–158.
27. Zhang, D.; Gao, A.; Xu, Y.; Yin, X.-B.; Hea, X.-W.; Zhangab, Y.-K. Gd-Al co-doped mesoporous silica nanoparticles loaded with Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> as a dual-modality probe for fluorescence and magnetic resonance imaging. *Analyst* 2014, 139, 4613–4619.

28. Sharma, P.; Brown, S.C.; Bengtsson, N.; Zhang, Q.; Walter, G.A.; Grobmyer, S.R.; Santra, S.; Jiang, H.; Scott, E.W.; Moudgil, B.M. Gold-speckled multimodal nanoparticles for noninvasive bioimaging. *Chem. Mater.* 2008, 20, 6087–6094.
29. Lin, Y.-S.; Hung, Y.; Su, J.-K.; Lee, R.; Chang, C.; Lin, M.-L.; Mou, C.-Y. Gadolinium(III)-incorporated nanosized mesoporous silica as potential magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 15608–15611.
30. Cao, M.; Wang, P.; Kou, Y.; Wang, J.; Liu, J.; Li, Y.; Li, J.; Wang, L.; Chen, C. Gadolinium(III)-chelated silica nanospheres integrating chemotherapy and photothermal therapy for cancer treatment and magnetic resonance imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 25014–25023.
31. Hu, X.; Wang, M.; Miao, F.; Ma, J.; Shena, H.; Jia, N. Regulation of multifunctional mesoporous core-shell nanoparticles with luminescence and magnetic properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* 2014, 2, 2265–2275.
32. Huang, S.; Cheng, Z.; Ma, P.; Kang, X.; Daia, Y.; Lin, J. Luminescent  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  functionalized mesoporous silica nanoparticles for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Dalton Trans.* 2013, 42, 6523–6530.
33. Shao, Y.; Tian, X.; Hu, W.; Zhang, Y.; Liu, H.; He, H.; Shen, Y.; Xie, F.; Li, L. The properties of  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ -assembled silica nanocomposite targeted nanoprobe and their application in MRI. *Biomaterials* 2012, 33, 6438–6446.
34. Cho, H.K.; Cho, H.-J.; Lone, S.; Kim, D.-D.; Yeum, J.H.; Cheong, I.W. Preparation and characterization of MRI-active gadolinium nanocomposite particles for neutron capture therapy. *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 15486–15493.
35. Hu, K.-W.; Jhang, F.-Y.; Su, C.-H.; Yeh, C.-S. Fabrication of  $\text{Gd}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /silica/gold hybrid particles as a bifunctional agent for MR imaging and photothermal destruction of cancer cells. *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 2147–2153.
36. Xing, H.; Bu, W.; Zhang, S.; Zheng, X.; Lic, M.; Chen, F.; Hea, Q.; Zhou, L.; Peng, W.; Hua, Y.; et al. Multifunctional nanoprobe for upconversion fluorescence, MR and CT trimodal imaging. *Biomaterials* 2012, 33, 1079–1089.
37. Yeh, C.-S.; Su, C.-H.; Ho, W.-Y.; Huang, C.-C.; Chang, J.-C.; Chien, Y.-H.; Hung, S.-T.; Liao, M.-C.; Ho, H.-Y. Tumor targeting and MR imaging with lipophilic cyanine-mediated near-infrared responsive porous Gd silicate nanoparticles. *Biomaterials* 2013, 34, 5677–5688.
38. Cabrera-García, A.; Vidal-Moya, A.; Bernabeu, A.; Sánchez-González, J.; Fernández, E.; Botella, P. Gd-Si oxide mesoporous nanoparticles with pre-formed morphology prepared from a Prussian blue analogue template. *Dalton Trans.* 2015, 44, 14034–14041.
39. Perrier, M.; Kenouche, S.; Long, J.; Thangavel, K.; Larionova, J.; Goze-Bac, C.; Lascialfari, A.; Mariani, M.; Baril, N.; Guérin, C.; et al. Investigation on NMR relaxivity of nano-sized cyano-bridged coordination polymers. *Inorg. Chem.* 2013, 52, 13402–13414.
40. Zhang, L.; Wu, H.B.; Lou, X.W. Metal-organic-frameworks-derived general formation of hollow structures with high complexity. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 10664–10672.

41. Zhang, L.; Wu, H.B.; Madhavi, S.; Hng, H.H.; Lou, X.W. Formation of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Microboxes with hierarchical shell structures from metal–organic frameworks and their lithium storage properties. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 17388–17391.
42. Engström, M.; Klasson, A.; Pedersen, H.; Vahlberg, C.; Per-Olov, K.; Uvdal, K. High proton relaxivity for gadolinium oxide nanoparticles. *Magn. Reson. Mater. Phys.* 2006, 19, 180–186.
43. Osseni, S.A.; Lechevallier, S.; Verelst, M.; Perriat, P.; Dexpert-Ghys, J.; Neumeyer, D.; Garcia, R.; Mayer, F.; Djanashvili, K.; Peters, J.A.; et al. Gadolinium oxysulfide nanoparticles as multimodal imaging agents for T2-weighted MR, X-ray tomography and photoluminescence. *Nanoscale* 2014, 6, 555–564.
44. Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M.R.; Monopoli, M.P.; Bombelli, F.B.; Laurent, S. Protein–Nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem. Rev.* 2011, 111, 5610–5637.
45. Clemments, A.M.; Muniesa, C.; Landry, C.C.; Botella, P. Effect of surface properties in protein corona development on mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* 2014, 4, 29134–29138.
46. Lu, J.; Liong, M.; Li, Z.; Zink, J.I.; Tamanoi, F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small* 2010, 6, 1794–1805.
47. Botella, P.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Muniesa, C.; Miranda, S.; Quesada, M.; Ruiz, J.; Schwartz, S., Jr.; Corma, A. Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. *J. Control. Release* 2011, 10, 246–257.
48. Na, H.B.; Lee, J.H.; An, K.; Park, Y.I.; Park, M.; Lee, I.S.; Nam, D.-H.; Kim, S.T.; Kim, S.-H.; Kim, S.-W.; et al. Development of a T1 contrast agent for magnetic resonance imaging using MgO nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 5397–5401.
49. Kim, T.; Cho, E.-J.; Chae, Y.; Kim, M.; Oh, A.; Jin, J.; Lee, E.-S.; Baik, H.; Haam, S.; Suh, J.-S.; et al. Urchin-shaped manganese oxide nanoparticles as pH-responsive activatable T1 contrast agents for magnetic resonance imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 10589–10593.
50. Lim, E.-K.; Kim, T.; Paik, S.; Haam, S.; Huh, Y.-M.; Lee, K. Nanomaterials for theranostics: Recent advances and future challenges. *Chem. Rev.* 2015, 115, 327–394.
51. Maschrak, P.K. Convenient synthesis of tris(tetraethylammonium) hexacyanoferrate(III) and its use as an oxidant with tunable redox potential. *Inorg. Chem.* 1986, 25, 245–247.
52. Blüml, S.; Schad, L.R.; Stepanow, B.; Lorenz, W.J. Spin-lattice relaxation time measurement by means of a TurboFLASH technique. *Magn. Reson. Med.* 1993, 30, 289–295.
53. Hennig, J.; Friedburg, H. Clinical applications and methodological developments of the RARE technique. *Magn. Reson. Imaging* 1988, 6, 391–395.
54. Hennig, J.; Nauerth, A.; Friedburg, H. RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn. Reson. Med.* 1986, 3, 823–833.



**Artículo:** Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment. **Scientific Reports** vol. 6, no. October, pp. 1–16, 2016. DOI 10.1038/srep36086

## Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment

Jose M. Ayuso<sup>1,2,3</sup>, María Virumbrales-Muñoz<sup>1,2,3</sup>, Alodia Lacueva<sup>1,2,3</sup>, Pilar M. Lanuza<sup>4,5</sup>, Elisa Checa-Chavarria<sup>6,7</sup>, Pablo Botella<sup>8</sup>, Eduardo Fernández<sup>6,7</sup>, Manuel Doblare<sup>1,2,3</sup>, Simon J. Allison<sup>9</sup>, Roger M. Phillips<sup>10</sup>, Julián Pardo<sup>4,5,11,12</sup>, Luis J. Fernandez<sup>1,2,3,\*</sup> & Ignacio Ochoa<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Group of Structural Mechanics and Materials Modelling (GEMM), Centro Investigación Biomedica en Red. Bioingeniería, biomateriales y nanomedicina (CIBER-BBN), Spain. <sup>2</sup>Aragón Institute of Engineering Research (I3A), University of Zaragoza, Spain. <sup>3</sup>Aragón Institute of Biomedical Research, Instituto de Salud Carlos III, Spain. <sup>4</sup>Aragón Health Research Institute (IIS Aragón), Biomedical Research Centre of Aragón (CIBA), Zaragoza, Spain. <sup>5</sup>Dpt. Biochemistry and Molecular and Cell Biology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain. <sup>6</sup>Centro Investigación Biomedica en Red. Bioingeniería, biomateriales y nanomedicina (CIBER-BBN), Spain. <sup>7</sup>Bioengineering Institute, University Miguel Hernández, Spain. <sup>8</sup>Instituto de Tecnología Química (Universitat Politècnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Spain. <sup>9</sup>Department of Biology, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield HD1 3DH, United Kingdom. <sup>10</sup>Department of Pharmacy, University of Huddersfield, Queensgate, Huddersfield HD1 3DH, United Kingdom. <sup>11</sup>Dpt. Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain. <sup>12</sup>Aragón I+ D Foundation (ARAID), Government of Aragón, Zaragoza, Spain. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.J.F. (email: Luis Fernandez-luisf@unizar.es) or I.O. (email: Ignacio [Ochoa-iochgar@unizar.es](mailto:Ochoa-iochgar@unizar.es))

### Introduction

A characteristic feature of solid tumours is their unique physiological and biological microenvironment, which consists of multiple cell types and gradients of oxygen tension, nutrients and waste products which vary as a function of distance from a supporting blood vessel [1–5]. This tumour microenvironment has significant biological and therapeutic implications including the promotion of a more aggressive cancer phenotype and increased cellular resistance to radiotherapy and chemotherapy [6–8]. In the search for novel therapeutics, the use of more physiologically relevant experimental models that can mimic key aspects of the tumour microenvironment *in vitro* is required [9–11]. One of the models that is currently used is the three-dimensional multicellular spheroid, however, this model also has a number of key limitations: (i) some cell lines do not form spheroids; (ii) although spheroid size can be controlled, cell density within a spheroid cannot; (iii) controlling the extracellular matrix (ECM) within a spheroid is not possible; and (iv) direct visualization of cells within the microenvironment created by the spheroid is difficult in real-time due to the thickness of the viable rim of the spheroid (typically a few hundred

microns) [10,12]. Analysis of the effects of the spheroid microenvironment on tumour cell biology and drug response typically requires fixation and sectioning of spheroids [13] or cell disaggregation by sequential disaggregation of the spheroid [14]. Although laser confocal microscopy can be used to visualize spheroids in real-time, this technique has a maximum depth penetration of approximately 50  $\mu\text{m}$ , which is not enough to visualize cells within the hypoxic region of spheroids [15]. Other techniques such as light sheet microscopy could increase this visualization depth but these techniques are technically challenging and not widely available [16]. There is therefore a need to develop and validate new experimental models of the tumour microenvironment.

In this context, microfluidic systems have emerged as a potential way of recreating important aspects of the tumour microenvironment *in vitro* and analysing cellular effects in real-time. These systems have been used to visualize cellular processes in real-time such as tumour cell chemotaxis, angiogenesis, tumour cell extravasation, tumour-stroma cross-talk and cellular responses to drugs [17–23]. However, the focus of most microfluidic research remains within the engineering field, requiring highly specialist equipment and resources for microdevice fabrication (for example clean room processing, slow manufacturing processes and in-depth knowledge of fluid dynamics) [24]. Microdevices that are easier to fabricate and operate will encourage the more widespread adoption of microfluidic devices in biomedical and pharmacological research. This article presents an easy-to-operate microdevice which can mimic the three dimensional architecture of multicellular spheroids, whilst at the same time generating a visible, live “tumour slice” that allows easy monitoring of cells in different regions of the microenvironment in real-time as well as their response to different drugs. This model also has the potential to assess the ability of drugs to penetrate through several cell layers which can be a major barrier to effective drug treatment [25].

The microdevice comprises a central microchamber flanked by two lateral microchannels separated by a series of projections. This design has been shown to be robust and versatile, since it allows for liquid confinement in the central microchamber without invading the lateral microchannels [19,26,27]. For this study, tumour cells were embedded within a collagen hydrogel thereby mimicking the ECM, and confining cells to the central microchamber. The lateral microchannels were used to perfuse different media or compounds and due to the configuration of the central chamber, normoxic, hypoxic and necrotic regions were naturally generated. Colon and Glioblastoma tumour cell behaviour in different regions of the microdevice were studied and analysed in conjunction with measurements of hypoxia and glucose concentrations across the device. The potential of this technology for analyzing the impact of microenvironmental parameters on drug response is exemplified by the differential cellular response to several well-known drugs in different parts of the microdevice.

## Results

### Microdevice operation and visualization of cells.

Polystyrene-based microdevices were fabricated by injection moulding, and attached to Petri dishes using biocompatible adhesive (Fig. 1A). The microdevice was designed so that each of the microchambers could be individually loaded with liquid without liquid spreading to adjoining chambers, allowing for the development of a '3D cell culture' system with injected hydrogel confined to the central chamber (Fig. 1B). The lateral microchannels remained hydrogel-free and effectively served as 'surrogate blood vessels' for the delivery of nutrients, oxygen, NK cells and drugs as required (Fig. 1C). For both the microdevice and the spheroid experiments shown in Fig. 1D,E, adherent U-251 MG cells were trypsinized and after detachment were labelled with Vybrant® Dio in suspension in order to fluorescently label the entire cell population. Following 3 days of incubation in the microdevice, Vybrant® Dio labelled U-251 MG cells were clearly visible throughout the central chamber of the microdevice (Fig. 1D). In contrast, for multicellular spheroids formed from Vybrant® Dio labelled U-251 MG cells, only the cells on the periphery of the spheroid were visible by confocal microscopy (Fig. 1E,F and Supporting Fig. 2). This indicates one of the key limitations of the multicellular spheroid versus the microdevice, with Vybrant® Dio labelled U-251 MG cells only being visible on the spheroid periphery despite there being fluorescent cellular labeling throughout.

### Analysis of fluid flow.

After loading the central chamber of the device with hydrogel (without cells) and allowing time for its complete polymerization, 10 µl of cell culture media containing 0.2 µm green-fluorescent polystyrene beads was injected by manual pipetting through one of the lateral microchannel. Using fluorescence time-lapse microscopy, the flow profile was analysed and observed to be completely parallel to the central microchamber with no interstitial flow into or through the hydrogel located in the central microchamber (Fig. 2A,B and Supporting movie 1). This indicates the high flow resistance generated by the collagen hydrogel confined in the central microchamber. However, when volumes of 300 µl were injected through one of the lateral microchannels, a clear interstitial flow was observed into the central microchamber although the fluorescent sphere front did not reach the opposite lateral microchannel (Fig. 2C,D and Supporting movie 2). The hydrogel exerted a high flow resistance, causing that major part of the fluid to flow through the lateral microchannel (Fig. 2E). Given that the central microchamber has an internal volume of 2 µl, this suggests that less than 1% of the injected volume (300 µl) was entering the hydrogel. This suggests that in order to completely replace or replenish the medium inside the hydrogel a large volume of medium (e.g. 1–2 ml) should be injected. These results show that by simply altering the volume of solution manually pipetted through one of the lateral microchannels, it is possible to generate parallel flow or interstitial flow as desired without the need for any additional equipment or pumps.

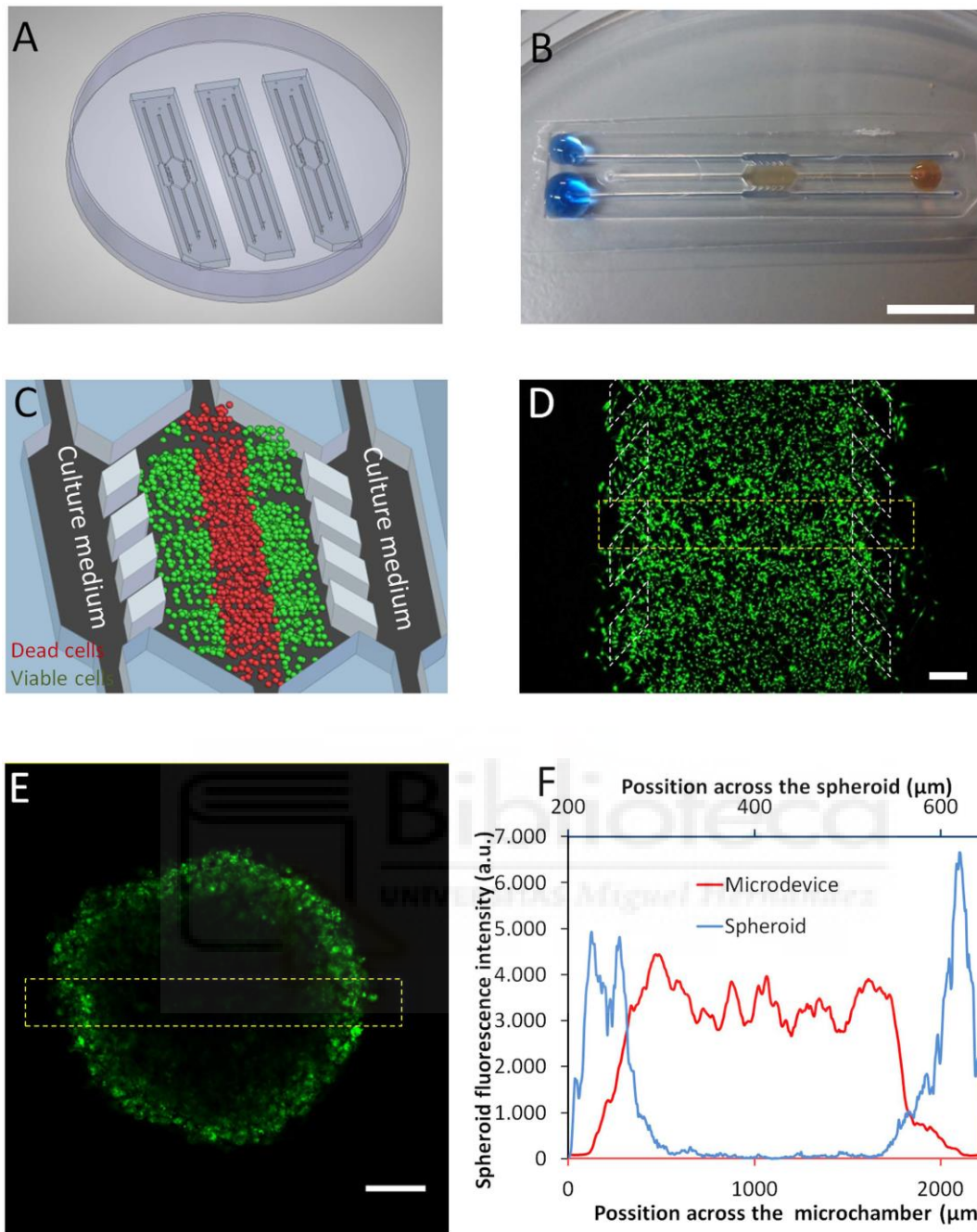
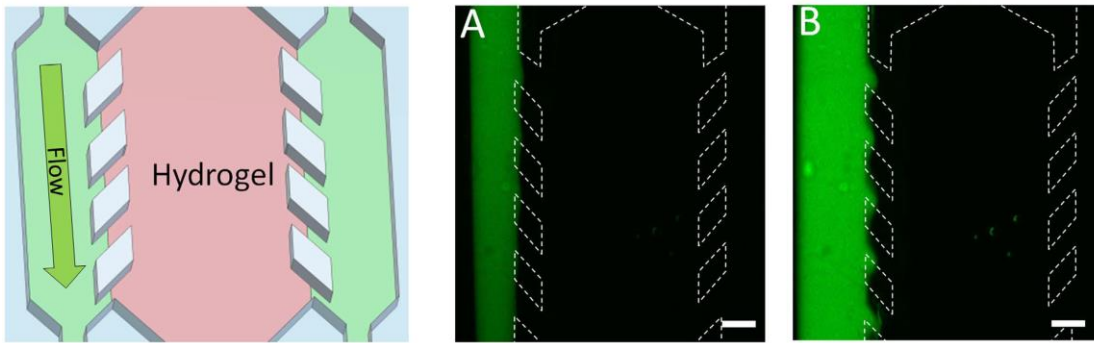


Figure 1. Microdevice operation and modelling of the tumour microenvironment. (A) Appearance of the microdevice. Microdevices are fabricated by injection moulding and can be attached to the bottom of a Petri dish using biocompatible adhesive; three identical devices are shown. (B) Magnified image of a microdevice with collagen hydrogel confined to the central microchamber and blue-coloured water perfused through the two lateral microchannels to ease visualization. Droplets are located on top of the inlets to prevent evaporation. Scale bar is 1 cm. (C) The principle of the live 'tumour slice': Culture medium perfused through the lateral microchannels provides nutrients and oxygen creating physiological gradients across the device. Cells near the 'surrogate' blood vessels are viable, whereas oxygen-poor cells in the centre of device start to die creating a 'necrotic core' similar to the necrotic regions of tumours. (D) Cellular visualization in the microdevice. 20 million U-251 MG cells/ml were embedded in collagen and pipetted into the central chamber of the microdevice. Image shows appearance by confocal microscopy 24 h later. Cells were labelled before injection with the green-fluorescent lipid dye Dio Vybrant® which stains cell membranes enabling all cells to be visualized. Scale bar is 400 μm. (E) Incomplete cell visualization within a multicellular spheroid due to its thickness. 10000 U-251 MG cells were labelled with green-fluorescent Dio Vybrant® dye, in suspension to ensure all cells were equally labelled and these were used to form the spheroid. Scale bar is 400 μm. (F) Quantification of cellular fluorescence across the yellow bordered regions in the microdevice and the spheroid as indicated in (D,E).



## Parallel flow



## Interstitial flow

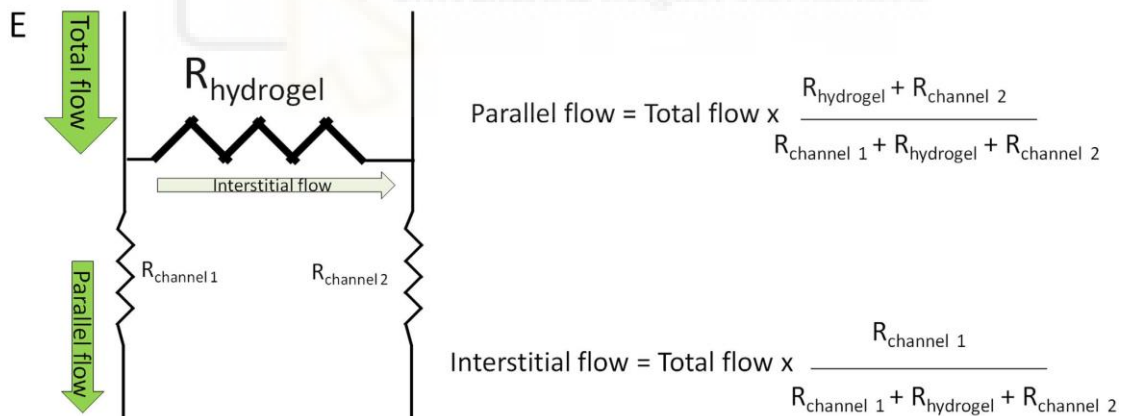
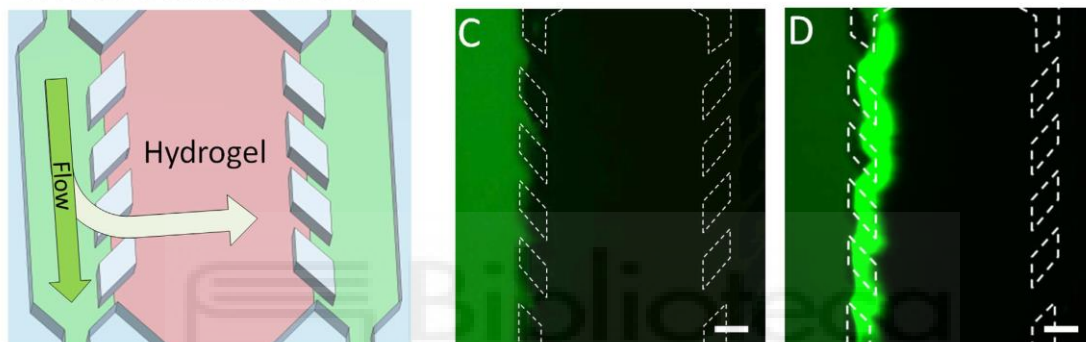


Figure 2. Flow characterization. After collagen hydrogel polymerization, green fluorescent beads were suspended in PBS and perfused through the left lateral microchannel. (A,B) When low volumes (10  $\mu$  l) were injected, the flow profile observed was completely parallel to the hydrogel and no sphere penetration into the hydrogel was observed. (C,D) When large volumes (300  $\mu$  l) were injected, an interstitial flow through the hydrogel was observed, showing sphere penetration into the hydrogel. Scale bar is 400  $\mu$  m. (E) Parallel and interstitial flow are determined by the indicated parameters, where “ $R_{\text{hydrogel}}$ ” is the flow resistance generated by the hydrogel, and “ $R_{\text{channel}}$ ” is the flow resistance through the lateral microchannels.

### Cell viability analyses.

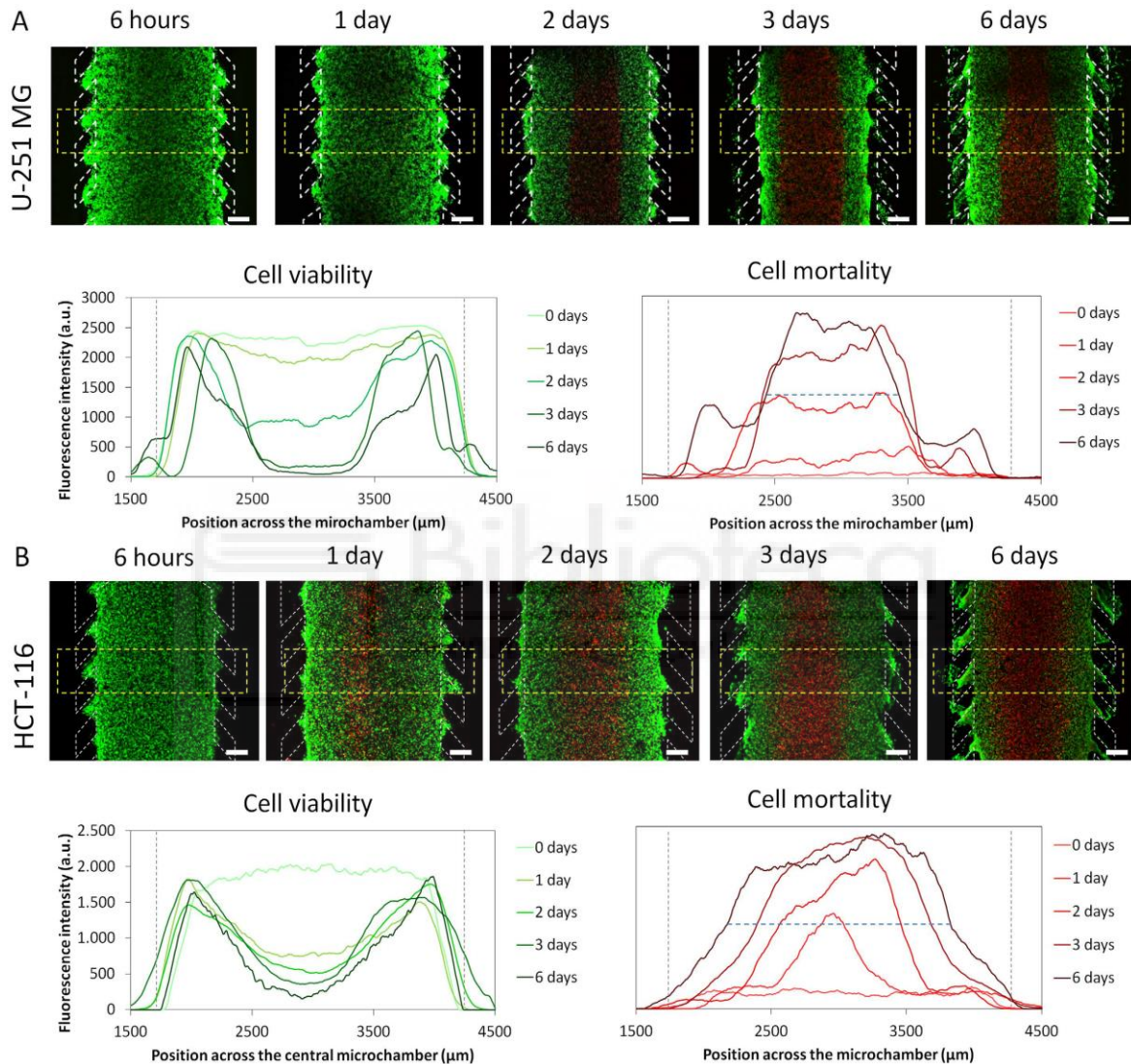
U-251 MG cells were embedded in collagen in the central microchamber of the device at different cell densities and were cultured for several days. This was to determine whether a necrotic region was formed

within the central microchamber, which is typical of the tumour microenvironment *in vivo*. After three days, for cells embedded at the highest cell density (40 million U-251 MG cells/ml) a distinct central region or 'belt' of cells lacking viable calcein (CAM) staining and positive for propidium iodide (PI) was observed (Supporting Fig. 3). Positive PI staining indicates loss of cell membrane integrity and is routinely used to detect cellular necrosis and cells in the late stages of apoptosis as well as several other forms of cell death. In contrast, microdevices initially seeded with 4 or 10 million U-251 MG cells/ml showed no significant PI staining by 3 days.

To study the kinetics of 'necrotic core' formation, U-251 MG and HCT-116 cell viability was evaluated at different time points after introducing cells into the central chamber. In experiments using U-251-MG cells, cells staining positive for PI gradually appeared in the centre of the microchamber over the first 3 days. Inversely, the thickness of the viable region, as indicated by CAM staining, decreased as time increased (Fig. 3A). The system stabilized after 3 days, and no further changes were observed in either the viable or necrotic region after longer culture times of up to 6 days (Fig. 3A, graphs). The experiment was repeated using HCT-116 cells, with fluorescence time-lapse microscopy showing a clear, central 'necrotic region' appearing by 24 hours which was significantly faster than for the U-251 MG cells (Fig. 3B and Supporting Movie 3). Additionally, the HCT-116 necrotic core generated was significantly larger in size than that of the U-251 MG cells at 6 days ( $1643 \pm 9$  microns versus  $1011 \pm 12$  microns respectively).



Figure 3. Necrotic core generation within the microdevice. U-251 MG and HCT-116 cells were embedded in collagen hydrogel in the central microchamber. (A) 40 million U-251 MG cells/ml were confined in the central microchamber and cell viability was evaluated at the indicated times using calcein (CAM) to stain viable cells green and propidium iodide (PI) to stain dead cells red. The graphs show CAM or PI fluorescence intensity profile along the delimited region in the images. Position of the pillars is delimited by a grey dashed line. (B) HCT-116 cells evaluated under identical experimental conditions showed faster necrotic core generation. The width of the necrotic core after 6 days was measured as the distance between those positions in the microchamber that reached 50% of the maximum PI fluorescence intensity (blue dashed horizontal line). Necrotic core width for U251-MG cells was  $1011 \pm 12 \mu\text{M}$ , and for HCT-116 cells was  $1643 \pm 9 \mu\text{M}$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ . Scale bar is  $400 \mu\text{m}$ .



### Cell proliferation analyses.

The formation over time of a central 'necrotic core' furthest from the peripheral channels suggested the development of gradients of nutrients and oxygen across the chamber. The assumption was that cells close to the peripheral channels should be well nourished and oxygenated, whereas cells some distance away from these 'surrogate blood vessels' would suffer from nutrient and oxygen deprivation. To study possible effects this might have on cell proliferation in addition to the observed effects on cell survival, both U-251 MG and HCT-116 cell lines were transiently transduced with FUCCI cell cycle fluorescent reporters. These fluorescent reporters change colour depending on the position of the cell in the cell cycle

with quiescent and G1 cells fluorescing red, cells progressing from G1 into S phase fluorescing yellow and proliferative cells in S, G2 or M phase fluorescing green. In order to more easily visualize active cell cycling and proliferation in real-time, only 5% of the total cells were transduced, whereas the other 95% of the cells remained unstained. A few minutes after injecting HCT-116 cells into the microdevices, only a few 'green' cells were observed, whereas a higher number of 'red' cells were detectable, both randomly distributed across the chamber. This was consistent with a higher proportion of the cell population being in G1 phase (Fig. 4A,B). Time-lapse fluorescence microscopy showed that after 1 day in the microdevice, only those cells located near to the lateral microchannels were actively proliferating and 'green' S phase or G2/M phase cells could only be detected here (Fig. 4C–F). These results combined with the cell viability analysis described earlier demonstrate that a proliferative outer layer of cells is generated followed by a slower-proliferating or quiescent middle region and eventually a necrotic core as distance from the 'surrogate blood vessel' increases. In this way, the microdevice appears to create a 'visible' microenvironment that is similar in aspects to the actual tumour microenvironment. In contrast to multicellular spheroids, the microdevice generates a visual 'tumour slice' through the tumour microenvironment enabling direct visualisation of cells within the microenvironment. Interestingly, when this experiment was repeated using U-251 MG cells, no S or G2/M phase cells staining green were observed after 24 hours, whereas G1 phase cells staining red were randomly distributed (Supporting Fig. 4).



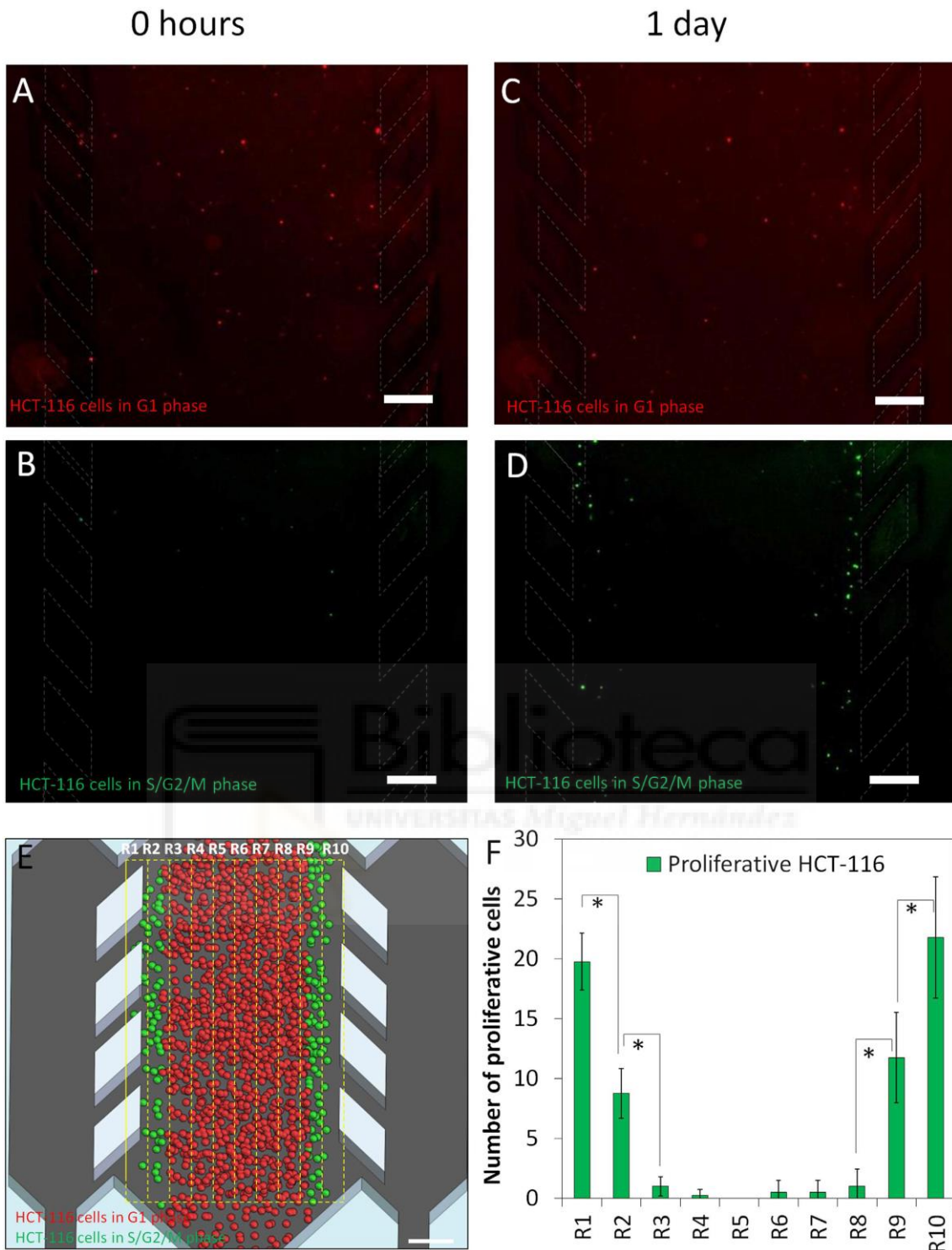


Figure 4. HCT-116 Cell proliferation. 40 million HCT116 cells/ml were confined to the central microchamber; 5% of these cells were transduced with the cell cycle sensor Premo FUCCI®, which stains G<sub>0</sub>/G1 phase cells in red and S, G2 and M phase cells in green. (A,B) After collagen polymerization, red staining cells (G1 phase or quiescent) were randomly distributed through the central microchamber, whereas only few cells stained green (S, G2 or M phase cells). (C,D) After 24 hours, an increase in green staining cells was clearly observed near the lateral microchannels indicating cell proliferation. (E,F) The central microchamber was vertically divided into ten regions (200 μm steps) and proliferation was quantified as the number of green cells observed in each region at 24 h compared to 0 h. Scale bar is 400 μm.

### **Oxygen and glucose gradients within the microdevices.**

The existence of an oxygen gradient across the microchamber was assessed using confocal time-lapse microscopy and a hypoxia-sensing dye (Image-iT Hypoxia Reagent, Life Technologies) that increases its fluorescence as oxygen tension inside the cell decreases. For both U-251 MG and HCT-116 cells, hypoxia-induced fluorescence gradually appeared during the first hours of the experiment (panels in Fig. 5A,B). A steep gradient of increasing hypoxia was observed along the first 300 microns through the “tumour slice” before reaching a plateau where oxygen concentrations had dropped to levels where the hypoxia sensing dye was fully activated. By creating an interstitial flow of fresh media through the hydrogel (as explained in Fig. 2), oxygen levels were restored to the initial values. Interestingly, just 4 hours later the hypoxia levels again reached the values observed after 24 hours in cell culture (graphs; Fig. 5A). These results demonstrate that hypoxia is generated within the microdevice and that this can be monitored and quantified in real-time. Furthermore, the levels of hypoxia can be manipulated by inducing an interstitial fluid flow through the microdevice.

The possible creation of a glucose concentration gradient across the microdevice was analysed using the fluorescent glucose analogue 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (NBDG). Glucose-free media supplemented with 200  $\mu\text{M}$  NBDG was perfused through one of the lateral microchannels and confocal time-lapse images were captured to study the diffusion profile. In the absence of cells, NBDG rapidly diffused through the hydrogel and after 90 min, the difference in fluorescence intensity between the NBDG-perfused microchannel and the opposite channel was only about 30% (Fig. 5C). When the experiment was repeated with 40 million cells/ml embedded in the collagen hydrogel, a different response was observed for the HCT-116 and U-251 MG cells. In the case of U-251 MG cells, NBDG appeared to penetrate through the hydrogel at a similar rate as in the absence of cells with no significant difference in the NBDG gradient generated. This suggests that glucose was able to penetrate across the ‘viable rim’ and into the ‘necrotic core’ of the U-251 MG cells. This is consistent with glucose being able to diffuse further than oxygen and support anaerobic metabolism which is a feature of the tumour microenvironment *in vivo*. It also indicates that U-251 MG glucose uptake rate was not sufficient to significantly delay the penetration of NBDG. In contrast, a very different NBDG gradient was generated in HCT116 cells where a higher NBDG-fluorescence intensity near the NBDG-perfused lateral microchannel was observed. In this case the gradient increased by nearly fifty percent compared to the control or the U-251 MG cell experiments (NBDG slope in the presence of HCT-116 = 0.035%/ $\mu\text{m}$  vs 0.022%/ $\mu\text{m}$ ).

### **Visualisation and characterization of ROS and apoptosis in the microdevice.**

Following the demonstration that a microenvironment is generated within the microdevice characterized by hypoxia and formation of a central ‘necrotic core’, the capability of the microdevice to study and quantify the induction of apoptosis and reactive oxygen species (ROS) was investigated. Apoptosis was detectable with embedded U-251 MG as well as with HCT-116 cells, but apoptosis was not confined to

the central 'necrotic core' region and was visible across the entire central chamber at similar levels (Fig. 6A,B). This suggests that the PI-positive dead cells observed in the 'necrotic core' are likely to be necrotic rather than due to progression of early stage apoptotic cells into late stage apoptosis.

ROS levels across the device were also analysed. These were relatively low but highest at the "tumour slice" edges, overlapping with the more oxygenated areas shown in Fig. 5A (Fig. 6C,D). The capability to quantify apoptosis and ROS in real-time in different regions of the 'tumour slice' is likely to be extremely useful both for basic research relating to the tumour microenvironment but also for drug response and mechanistic studies.

#### **Heterotypic cell interactions in the microdevice – migration of natural killer (NK) cells.**

The three chambers of the microdevice offer the opportunity to study heterotypic cell interactions and signalling as can occur in the actual tumour microenvironment. In order to demonstrate the capabilities of the microdevice to study cross-talk between tumour cells and the immune system, activated NK cells were perfused through one lateral microchannel, whereas GFP-expressing HC-T116 cells were confined in the central microchamber. Fluorescence time-lapse microscopy showed NK cells migrating from the lateral microchannel towards HCT-116 cells in the central microchamber with some NK cells penetrating into the "tumour-slice" (Supporting movie 4 and Supporting Fig. 5). This is a key advantage of the device compared to multicellular spheroid models, enabling real-time study of cell migration and dissection of whether an effect is due to direct heterotypic cell interactions or via heterotypic signalling.

#### **Drug penetration and evaluation of the impact of the microenvironment on drug responses.**

There is an increasing need to study drug responses *in vitro* under more physiological conditions that reflect the complexity of the tumour microenvironment. Effective targeting of typically chemoresistant cells residing in hypoxic regions is a strategic priority. Another key consideration in evaluating drugs, for example in a multicellular spheroid, is whether a lack of response relates to the drug being ineffective or due to impaired drug penetration resulting in the inability of the drug to reach all cells in sufficient quantities to induce a response. Drug penetration through collagen hydrogel in the central chamber of the microdevice was evaluated using the cytotoxic drug doxorubicin (DOX), which is a DNA intercalating agent that naturally fluoresces red. DOX was perfused through one of the two lateral microchannels and confocal images were taken at different times, showing rapid penetration of the DOX (Fig. 7A). In the absence of cells, DOX concentration was almost linearly distributed across the microchamber after 2 hours and the concentration at the DOX-perfused channel and the opposite channel was only 30% different (Fig. 7A). When the experiment was repeated with 40 million HCT-116 cells/ml in the hydrogel and the addition of DOX 24 h later, DOX penetrated at a similar rate (Fig. 7A), demonstrating that DOX was reaching the hypoxic/necrotic region (as shown in Figs 3 and 5).

To study drug toxicity, DOX was perfused through both lateral microchannels and cell viability was assessed after 3 days. DOX induced significant HCT-116 cancer cell kill in cells located near to the lateral

microchannels but induced much less cell kill further from the microchannels (Fig. 7B). For this experiment, DOX was found to efficiently penetrate into the hypoxic region suggesting that this difference in cytotoxic response may be due to a difference in the proliferative rate of the cells in these different regions (as has been shown in Fig. 4).

For Glioblastoma U-251-MG cells, the alkylating agent temozolomide (TMZ), which is in clinical use to treat Glioblastoma, was evaluated. For U-251 MG cells cultured in 2D for 7 days, TMZ significantly reduced viable cell number compared to controls (Supporting Fig. 6). As dead U-251 MG cells detached from the bottom of the Petri dish most of them were removed when the culture media was changed for viability staining, explaining the low apparent number of 'red' dead cells in the images. For cells seeded at the same cell density in 3D collagen hydrogels, cell proliferation over the same period was substantially reduced in 3D controls compared to 2D, indicating the impact of a 2D or 3D environment on cell growth. Consistent with a reduced proliferative rate and the mechanism of action of TMZ, which is dependent on DNA replication, TMZ had a much less dramatic effect on viable cell number for cells growing in hydrogel (Supporting Fig. 6). Indeed, TMZ had little effect compared to controls and just slightly higher levels of cell death were detected in the most oxygenated and more proliferative regions of the microdevice near the lateral microchannels (Fig. 8A,B,D).

A declining gradient of oxygen across the chamber provides the opportunity to evaluate potential hypoxiataargeting drugs or hypoxia-activated pro-drugs (HAPs). This is exemplified here using the HAP tirapazamine (TPZ). First, TPZ cytotoxicity was evaluated on cells embedded in 3D collagen hydrogels in Petri dishes that were cultured under normoxic (20% O<sub>2</sub>) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions. Under normoxic conditions, 100  $\mu$  M TPZ mildly reduced cell viability by less than 20% after 3 days, whereas 1 and 10  $\mu$  M TPZ had no effect (Supporting Fig. 7). When cultured under homogenous hypoxic conditions, TPZ displayed a much more dramatic effect with cell viability reduced by  $\approx$  80% at 100  $\mu$  M (Supporting Fig. 7). However, in the actual tumour microenvironment, cancer cells are exposed to a gradient of hypoxia with increasing distance from a blood vessel, which can be modelled in the microdevice (as has been shown in Fig. 5). U-251-MG cells were embedded within the microdevice and 24 h later, medium with 100  $\mu$  M TPZ was perfused through the lateral microchannels and cell viability was measured 3 days later. TPZ cytotoxicity closely correlated with levels of hypoxia with cell mortality highest in the innermost most hypoxic regions and with increasing distance from the lateral microchannels (Fig. 8C,D). In contrast, consistent with the activation of TPZ by hypoxia, those cells located near to the lateral microchannels, which are well oxygenated, remained viable (Fig. 8D).



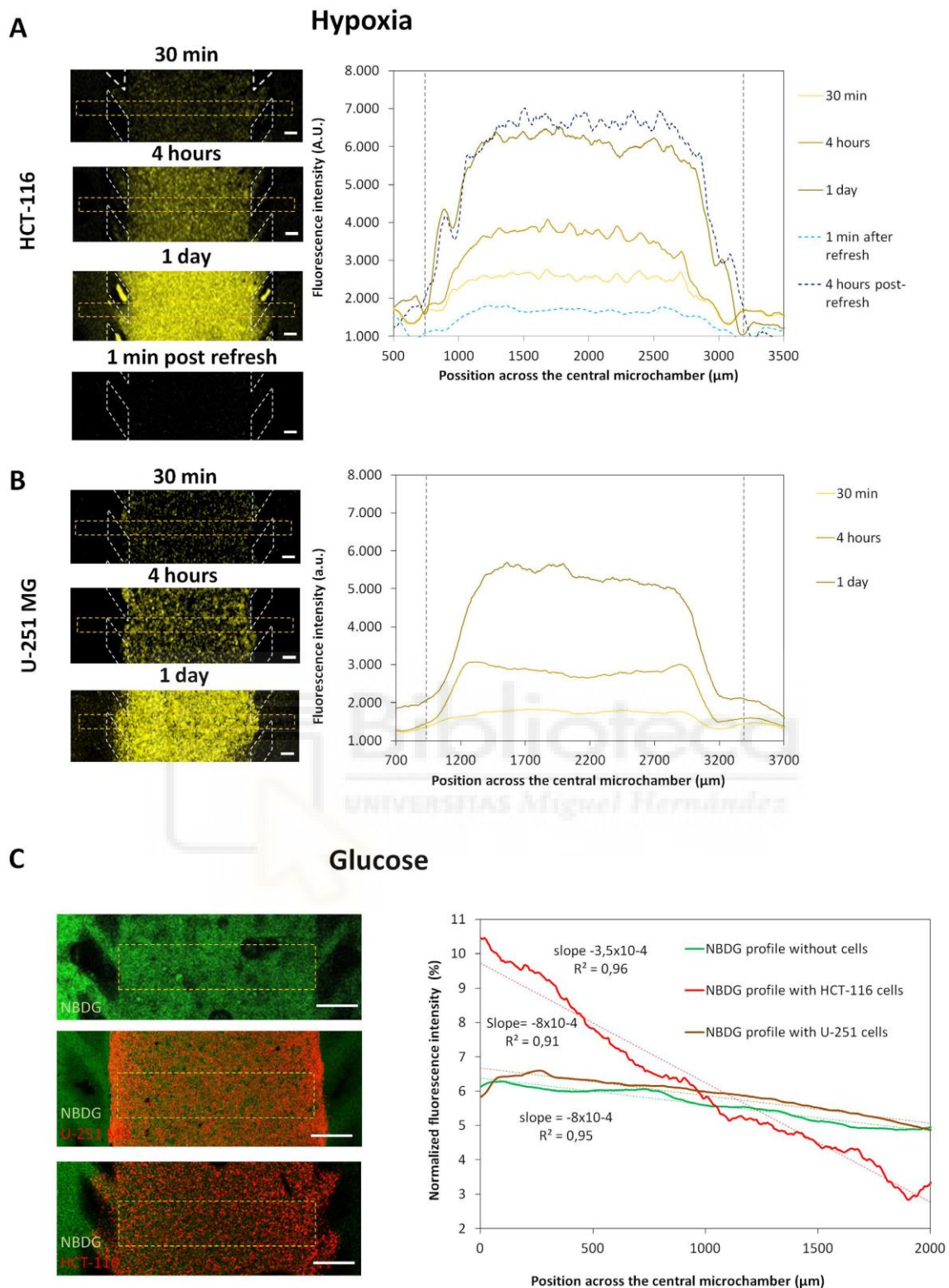


Figure 5. Oxygen and glucose profile. HCT-116 and U-251 MG cells were embedded within collagen hydrogel and cultured in the central microchamber. (A) A hypoxia-sensing dye was added to the hydrogel/cell mixture prior to injection within the microdevice to monitor and quantify the formation of the hypoxia gradient through the experiment in real-time. After collagen polymerization, culture medium containing the dye was added to the lateral channels to keep the dye concentration constant through the experiment. The left panels show hypoxia-induced fluorescence intensity in the central microchamber increased during the experiment as well as how the hypoxia signal disappeared when medium inside the hydrogel was 'refreshed' by interstitial flow. The graph shows the hypoxia-induced fluorescence profile across the central microchamber. The levels of hypoxia rapidly increased across the first 300  $\mu\text{m}$  and reached a plateau in the centre of the microchamber. 1

ml of fresh media perfused through one of the lateral microchannels, reduced hypoxia-induced fluorescence to initial 'normoxic' values. 4 hours post-refresh, the hypoxia-induced fluorescence reached again the values observed before. Scale bar is 200  $\mu$  m. Position of the pillars is delimited by a grey dashed line. (B) The same experiment was repeated for U-251 MG cells with similar effects observed. (C) Green fluorescent glucose analogue (NBDG, 200  $\mu$  M) was perfused through the left lateral microchannel and the diffusion profile was studied in the absence or presence of cells. The graph shows the NBDG diffusion profile across the central microchamber after 90 min, demonstrating that NBDG was able to penetrate through the collagen hydrogel. The diffusion profile slope was calculated in the absence of cells or in the presence of HCT-116 or U-251 MG cells. Scale bar is 400  $\mu$  m.



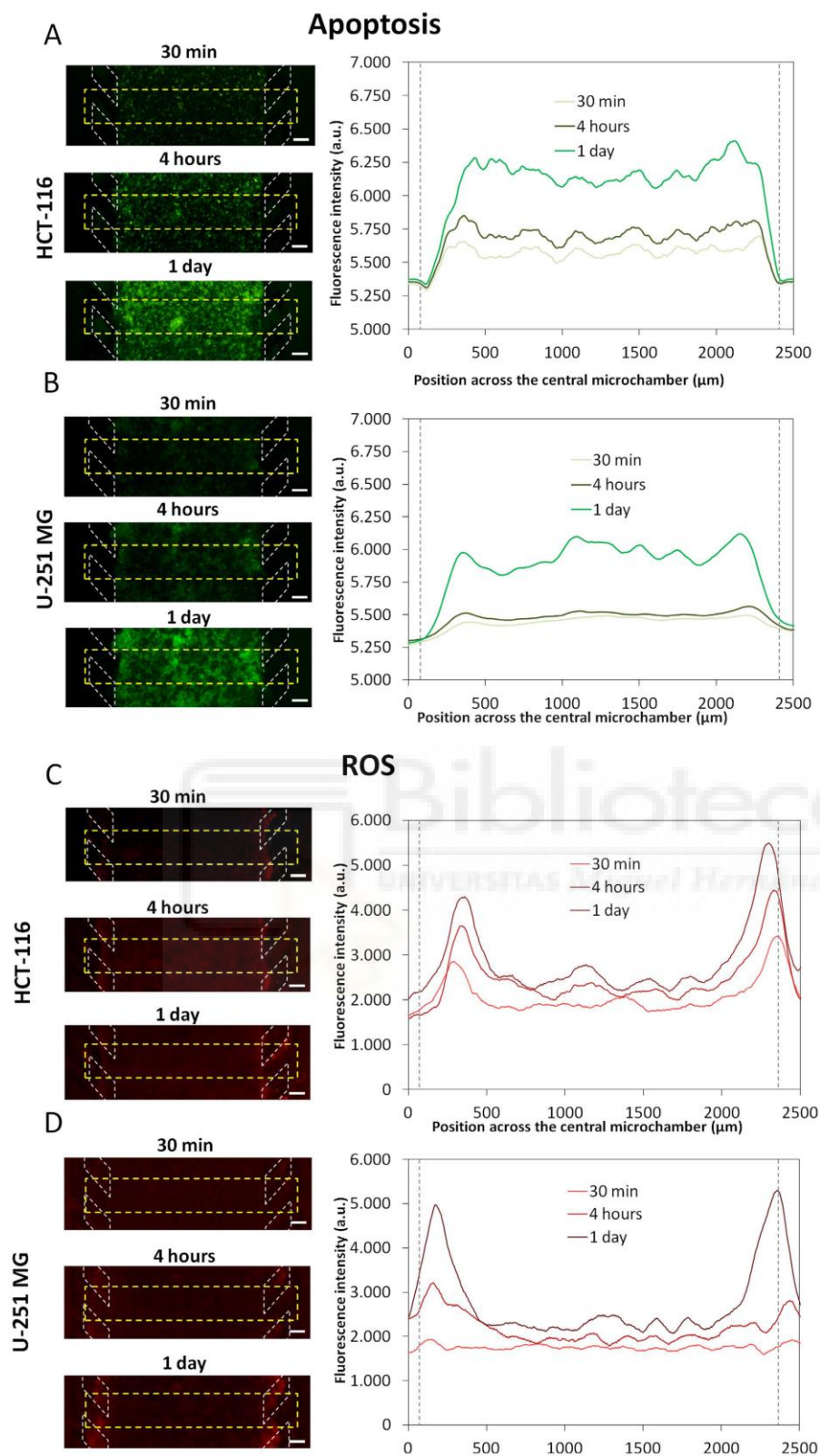


Figure 6. Apoptosis and ROS characterization. HCT-116 (A) and U-251 MG cells (B) were confined to the central microchamber of the device in hydrogel. An apoptosis sensing dye was perfused into the device via the lateral microchannels. For both cell lines, apoptotic levels were found to increase with time. The graphs show the apoptotic profiles across the delimited region. Position of the pillars is delimited by a grey dashed line. (C,D) For detection and monitoring of ROS production, a commercially available agent that is oxidised by ROS to a fluorescent product was perfused through the system. The graphs show quantification of ROS along the delimited region. Scale bar is 200  $\mu\text{m}$ .

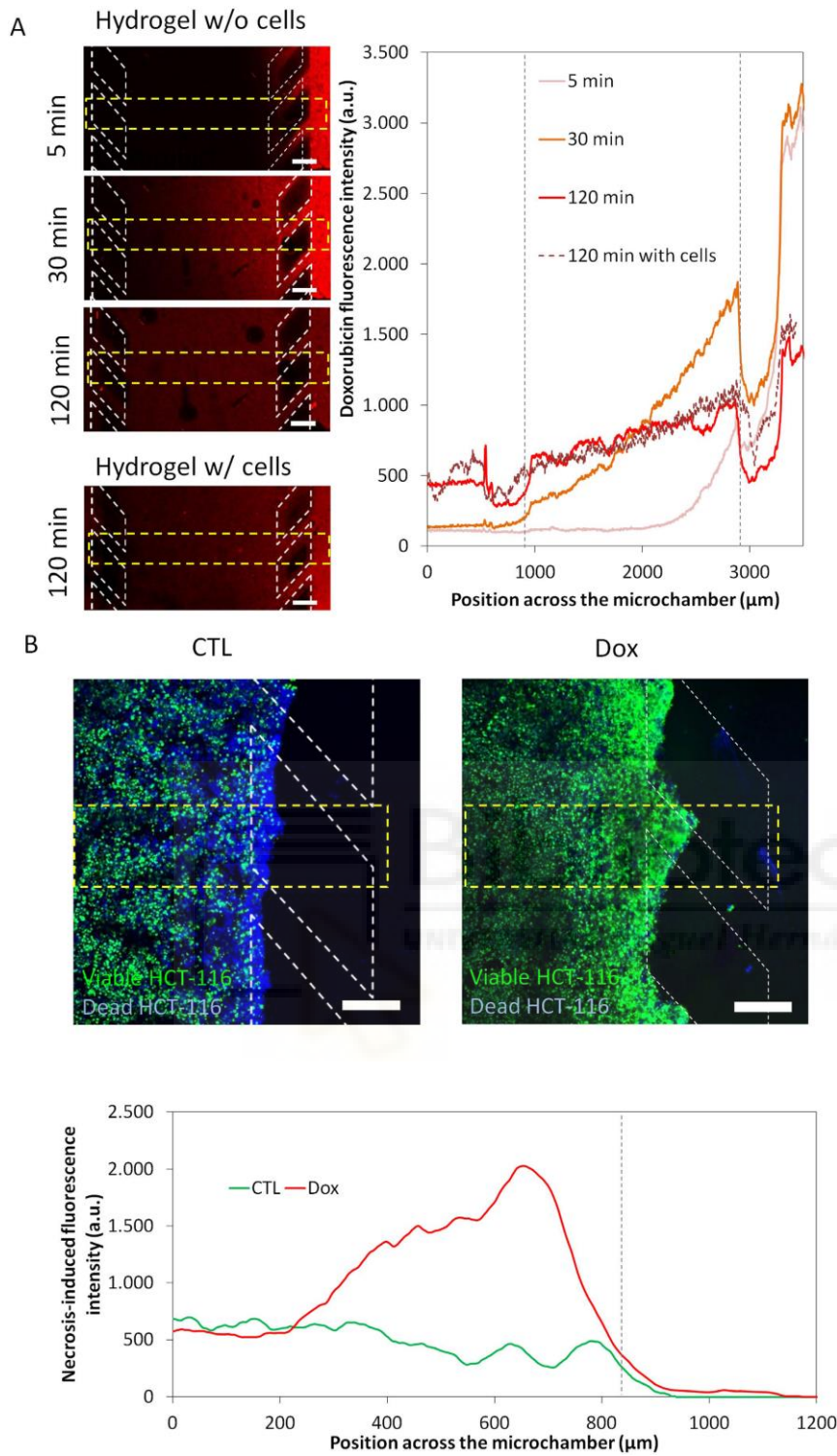


Figure 7. DOX effect on HCT-116 cells. The antiproliferative chemotherapy agent DOX was tested within the microdevice. (A)  $100\ \mu\text{M}$  DOX was perfused through one lateral microchannel to assess its penetration capacity through the hydrogel. The graph shows the DOX diffusion profile across the device with the time. Position of the pillars is delimited by a grey dashed line. (B)  $30\ \mu\text{M}$  DOX was perfused through both of the lateral microchannels to study the effects on cell viability. After 3 days in the presence of DOX, NucBlue® and NucGreen® dyes were perfused through the lateral microchannels. NucBlue® stains all cells blue whereas NucGreen® selectively stains dead cells green. The graph shows the strong effect of doxorubicin on HCT-116 cell mortality. The green fluorescence intensity was analysed along the delimited region. Scale bar is  $200\ \mu\text{m}$ .

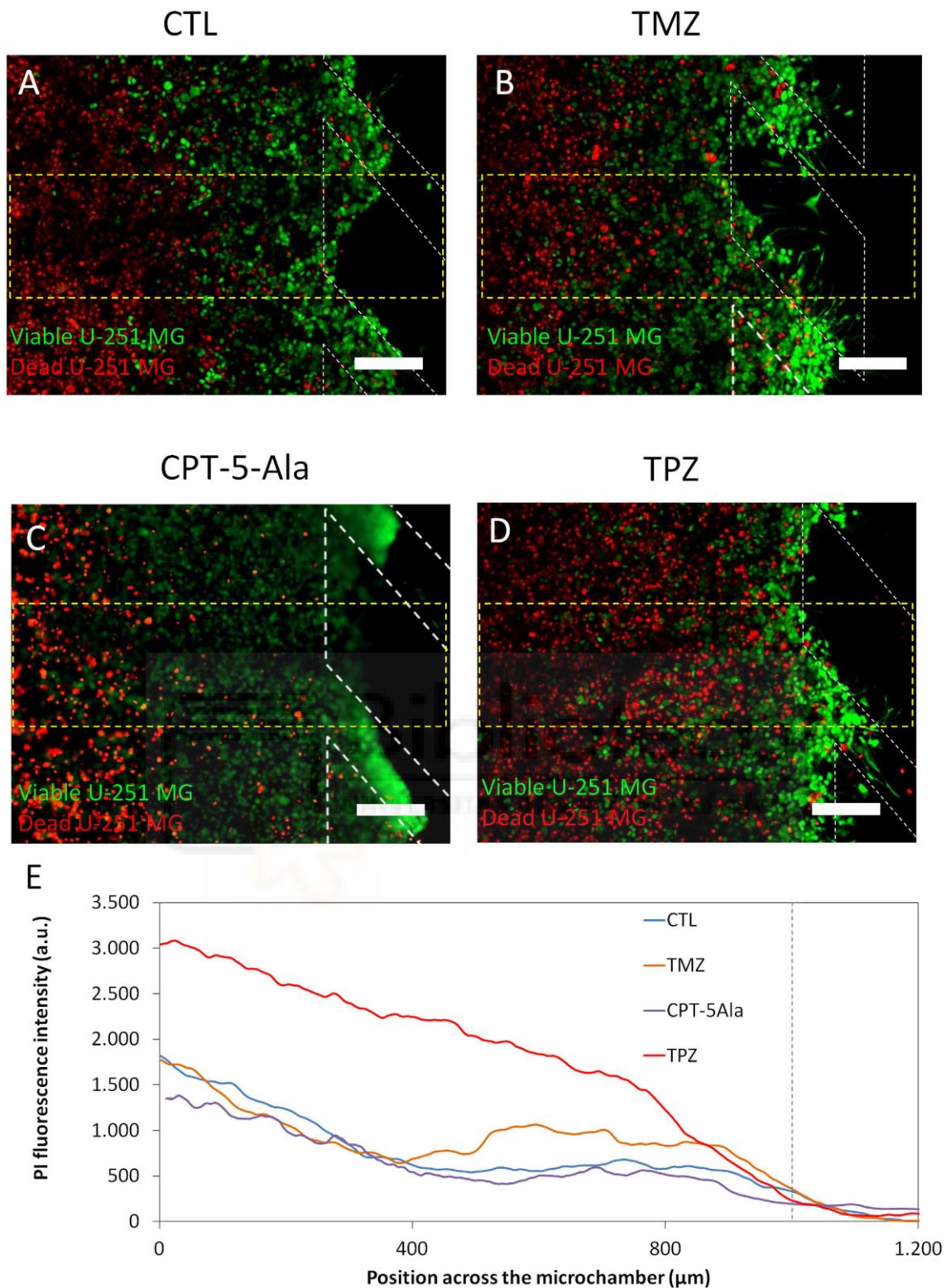


Figure 8. Drug effect on U-251 MG cells. U-251 MG cells were cultured within the central microchamber for 24 hours before drug addition in order to allow time for formation of a hypoxic region first. Growth medium (A), 100  $\mu$  M TMZ (B), 1.6  $\mu$  g/ml CPT-5Ala or 100  $\mu$  M TPZ (C) were perfused through both lateral microchannels and after 3 days cell viability was assessed using by PI/CAM staining. (E) The graphs show the PI fluorescence intensity along the delimited region, demonstrating that TMZ had a mild effect on U-251 MG cell viability. TPZ exerted a strong effect in the hypoxic areas. Position of the pillars is delimited by a grey dashed line. Scale bar is 200  $\mu$ m.

## Discussion

In the last few decades our knowledge and understanding of cancer cell biology has improved considerably. However, the clinical approval of new drugs has not kept pace with this increased understanding of cancer biology. Many of the new drug candidates that show promise in initial testing fail when they are tested in more advanced models and the clinic [28,29]. One key strategy to reduce the high attrition rate and cost associated with the discovery of anti-cancer drugs is to develop new *in vitro* preclinical models that are better predictors of success in advanced preclinical and clinical testing [28]. Conventional two-dimensional cell cultures are unable to mimic many critical aspects of tumour biology (i.e. nutrient and waste gradients, hypoxia, gradients of cellular proliferative status), leading to drug failure in more advanced stages of the drug development process. New experimental *in vitro* models that can mimic key aspects of the tumour microenvironment and allow early assessment of effects of the tumour microenvironment on cellular drug response are urgently needed.

Technical complexity has hindered microfluidic-based models being widely adopted by the biomedical community. Here we present a very simple and easy-to-operate model that closely mimics important aspects of the tumour microenvironment and enables monitoring in real-time. Using this model, the two different cancer cell lines we analysed, HCT-116 and U-251 MG, generated quite different tumour microenvironments: (1) differing in the size of their 'necrotic core'; (2) cellular rates of glucose uptake and oxygen consumption; and (3) their proliferative rates in different parts of the 'tumour slice' over time, particularly in the viable region nearest the 'surrogate blood vessels' (the lateral microchannels) (Figs 3, 4 and 5, Supporting Fig. 4). Due to their faster metabolism and proliferative rate, the HCT116 cells rapidly exhausted glucose and oxygen resulting in the formation of a necrotic region more quickly than the U-251 MG cells (Fig. 3). Formation of gradients of glucose and oxygen across the device were quantified in real-time (Fig. 5, Supporting Fig. 4). The ability to have a live visual 'window' through the 'tumour slice' as exemplified here by real-time monitoring of nutrients, viability and proliferation gradients highlights one of the key advantages of this model compared to the multicellular spheroids.

We also show that the microdevice can be used to measure other important factors such as levels of ROS and apoptosis in different parts of the 'tumour slice' in real-time. ROS are a product of cellular oxidative stress and a major cause of DNA damage and can, depending on circumstances, either promote cancer cell growth or be harmful to cancer cells [30,31]. In this context, the presented model could be used to study this phenomenon and the role of ROS in the mechanism of action of drugs that are being tested and their activity against cells in different parts of the microenvironment. In this study, in the absence of any drug treatment, ROS levels increased with culture time in the microdevice but were only detected near the "tumour-slice" edges, where oxygen was available.

Evasion of cell death by apoptosis is a major mechanism by which cancer cells survive and evolve and is a major target in the development of new drugs. We foresee a major potential application of the microdevice will be in the screening of new drug candidates and whether they are able to induce apoptosis

as part of their mechanism of action and, importantly, in which cells within the modelled tumour microenvironment. Here, we demonstrate that apoptosis can be quantified in real-time through the microdevice, our results showing that basal apoptotic levels increased through the 'tumour slice' with culture time. Interestingly, there was little variation in different regions of the 'tumour slice' indicating that generation of the 'necrotic core' was not associated with apoptosis.

As a preliminary evaluation of the potential of the microdevice for *in vitro* drug testing that assesses the effects of different aspects of the tumour microenvironment upon drug response, three well-established drugs were tested. DOX is a naturally red fluorescing compound in clinical use against colon cancer and other cancers that intercalates DNA and is cytotoxic towards actively proliferating cells. Our results showed that DOX was most cytotoxic against cells located at the hydrogel edges near the lateral microchannels, where nutrients were available allowing rapid cell proliferation. As DOX fluoresces red, we were also able to analyse the ability of doxorubicin to penetrate through the 'tumour slice' at the cell density used. Here, we show that at the cell density used, DOX was able to efficiently penetrate across the device indicating that the preferential cytotoxicity observed was due to the mechanism of action of DOX as opposed to issues of DOX reaching all cells. Drug penetration barriers for doxorubicin have been described in spheroids and other 3D models [32]. However, in our model the inclusion of the ECM implied a reduction of the cell density compared to multicellular spheroids; explaining the enhanced drug penetration. Interestingly, this barrier effect could be mimicked in our model by increasing the cell density injected. Furthermore, the possibility of creating interstitial fluid flow could be used to explore new alternatives to increase the drug penetration into the tumours [33]. In contrast TPZ, which is activated to a toxic radical by low oxygen, was most cytotoxic towards those cells in the innermost hypoxic regions furthest from the lateral microchannels. This indicates the suitability of the microdevice to assess drugs and their activity towards cells in parts of the tumour microenvironment (e.g. well-oxygenated, nourished vs hypoxic). Although TPZ caused an increased in cell mortality in hypoxic regions, it was unable to destroy the tumour cells located in the "normoxic" areas within the "tumour-slice" model. Combinatorial therapies based on the use of different drugs could be good alternatives to kill cells in different parts of the tumour microenvironment and could also be easily assessed using the microdevice.

In conclusion, we have described the development of a microfluidic-based assay that mimics different of the key features of the solid tumour microenvironment. This is a complex microenvironment that has a profound effect on the outcome of chemotherapy and incorporating models of this nature into drug discovery procedures may help reduce the high attrition rate. This model is technically simple and in contrast to other three-dimensional models such as multicellular spheroids, it provides a 'window' through which the effects of the microenvironment of tumour biology, heterotypic cell interactions, drug delivery and response to therapy can be observed and recorded in real-time. The model is inherently flexible and it offers the distinct advantage of being able to create microenvironmental conditions in cell lines that do not readily form three dimensional structures *in vitro*. Additionally, culture medium could be retrieved from the microdevices in order to perform a more quantitative analysis of the chemotactic

factors secreted by the cells. Finally, the microfluidic device described in this manuscript could reduce the number of animals required for *in vivo* testing as it could be positioned between traditional cell culture based evaluation and *in vivo* testing in preclinical drug development with only those compounds showing promising activity in the microfluidic model progressing onto *in vivo* testing.

## Methods

### Microdevice fabrication.

Polystyrene-based microdevices were designed in order to allow user-friendly operation, avoiding the need for specialized clean-room processing equipment. The microdevice geometry included a 2000  $\mu\text{m}$  wide central microchamber flanked by two 700  $\mu\text{m}$  wide lateral microchambers with the depths of the chambers being 250  $\mu\text{m}$ . The central microchamber was delimited by parallelogram-shaped pillars that allowed liquid and cell confinement within hydrogels as described elsewhere<sup>23</sup>. Lateral microchannels remained hydrogel-free and were perfused with media or drug-containing media. Dedicated inlets and outlets were also integrated to allow liquid or hydrogel injection by manual pipetting. The configuration of the microdevice is illustrated in Fig. 1A. Prior to their use in cell culture, microdevices were sterilized by submerging in 70% ethanol. After air-drying and 2 hours UV exposure, microdevices were ready for use

### Reagents.

Temozolomide (TMZ) (Sigma, T2577), Doxorubicin (DOX) (Selleckchem, S1208), Tirapazime (TPZ) (Sigma, SML0552) and Image-iT Hypoxia Reagent (Life Technologies, H10498) were dissolved in DMSO at 100, 100, 50 and 1 mM respectively. Image-iT Hypoxia Reagent was used in cell culture at 10  $\mu\text{M}$ , whereas DOX, TPZ and TMZ were used at varying concentrations (the final DMSO concentration used was < 0.1%). The CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermo, R37111) and the CellROX® Orange Reagent (Thermo, C10443) were used to detect apoptosis and ROS production respectively following supplier instructions.

### Prodrug synthesis.

A commercial camptothecin (CPT) novel derivative was prepared by esterification of 5-aminolevulinic acid (5-Ala). For this purpose, N-tert-butyloxycarbonyl-5-aminolevulinic acid (N-boc-5-Ala) was synthesized by reaction of di-tert-butyl dicarbonate with 5-Ala. Then, this product was esterified on 20(S)-hydroxyl 20 position of CPT, followed by deprotection of the amine group with trifluoroacetic acid, obtaining camptothecin-20(S)-5-aminolevulinate (CPT-5-Ala) of 90% purity according to HPLC-MS/MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR analysis (Supporting Fig. 1). The Camptothecin prodrug (CPT-5-ALA) was dissolved in DMSO and perfused through the microdevices at 1.6  $\mu\text{g/ml}$ .



### **Characterisation of flow.**

In order to study fluid flow through the microdevice, 0.2 µm-diameter green-fluorescent microsphere beads (Life Technologies, F8811) were diluted 1/100 in growth medium and perfused through the microdevice by manual pipetting.

### **Cell culture.**

Human cancer cell lines HCT-116 (colon carcinoma), U-251 MG (Glioblastoma) and Jurkat (leukaemia) were purchased from the American Type Culture Collection and routinely cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza, BE12-614F) supplemented with 10% v/v foetal bovine serum (FBS) (Sigma, F7524, non-USA origin), 2 mM L-glutamine (Lonza, 17-605C) and penicillin/streptomycin (Lonza, DE 17-602E) within a TEB-1000 humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator (EBERS Medical Technology) at 37 °C. The R69 lymphoblastoid B cell line was kindly provided by Dr López de Castro, from the "Severo Ochoa" Molecular Biology Centre (CBMSO) and were cultured in RPMI1640 (Sigma, R0883) supplemented with 10% FBS and L-glutamine.

### **Isolation and activation of human NK cells.**

Human NK cells were derived from the blood of healthy donors provided by the Blood and Tissue Bank of Aragon. After Ficoll gradient centrifugation of whole blood, freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were activated *in vitro* for 21 days. PBMC cultures were maintained in RPMI-1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FBS (HyClone™); 100 U/ml IL-2 (Miltenyi) and 5 ng/ml IL-15 (Miltenyi), mitomycin C-inactivated R69 cells at a 10:1 ratio (PBMC:stimulator cells); penicillin/streptomycin and glutamine. Culture medium was renewed on the 7th day followed by successive reactivation every 3 days to establish a cellular density of  $1 \times 10^6$  PBMCs/ml. Magnetic immune-separation using anti-CD56 antibodies (MACS, Miltenyi) was used to enrich for activated NK cells. The quality of NK cell activation was assessed by testing their cytotoxic potential against Jurkat cells as described previously<sup>34</sup>. Activated NK cells were fluorescently labelled with 3 µM eFluor670 (eBioscience; 65-0840) for 15 min to enable their discrimination from the tumour cells during the experiments. All protocols related with human samples were approved by the Ethical Committee of Clinical Research of Aragon (number: C.I.PI.11/006) and informed consent was obtained from all patients. Experiments were performed in accordance with the Spanish research regulations.

### **Fluorescent cell labelling.**

Dio and Dil Vybrant® lipophilic cell membrane dyes (Life technologies, V-22886 and V-22885) were used to fluorescently label cells green or red respectively as per the manufacturer's instructions. Briefly, after cell trypsinization, 5 µl of Vybrant® solution was added to 1 ml of cell suspension (106 cells/ml) and incubated for 5 min. Cell suspensions were then centrifuged and washed twice with growth medium.

### **Stable cell transfection with EGFP.**

U-251 MG and HCT-116 were stably transfected with EGFP using lentiviral vectors, kindly provided by Dr Prats, University Paul Sabatier, Toulouse, France [35]. Briefly,  $5 \times 10^4$  cells/well were seeded in 24-well plates and incubated for 24 hours at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Growth medium was then removed and cells were washed twice with PBS (Lonza, BE17-516F). Protamine supplemented-OptiMEM (5 µg/ml, Sigma-Aldrich, P4020) was mixed with the lentivirus suspension in a 1:1 ratio and this mixture was added to the cells. After 24 hours, transfection medium was replaced with growth medium and the cells were routinely cultured for two weeks in order to remove the viral particles. Transfection efficiency was checked by fluorescence microscopy and flow cytometry (BD, FACSAria) with more than 90% of the cells found to be EGFP-positive.

### **Spheroid generation.**

U-251 MG and HCT-116 multicellular spheroids were generated by the hanging drop method, supplementing the culture medium with methylcellulose [22]. Briefly, 6g of high viscosity methylcellulose (Sigma, M0512) was dissolved in 500 ml of high glucose DMEM to make a stock solution. Cells were trypsinized, counted and cell suspensions were generated at  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  cells/ml. These different cell suspensions were then mixed with the methylcellulose stock solution in a 4:1 ratio. Finally, 25 µl droplets ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  or  $1 \times 10^5$  cells/droplet) were placed onto the lid of Petri dishes with sterile water added to the bottom in order to reduce droplet evaporation and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Using this methodology a single well-defined spheroid of a particular size was generated per droplet.

### **3D cell culture within the microdevices.**

For preparation of three-dimensional cell cultures in collagen hydrogel, all reagents and microdevices were placed on ice. Cells were trypsinized and re-suspended in a calculated volume of growth medium to reach the desired cell concentration ( $4 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  or  $40 \times 10^6$  cells/ml) in the final hydrogel solution. Using a chilled tip, a mixture of 24.9 µl collagen type I (4.01 mg/ml, Corning 354236); 0.62 µl NaOH 1N (Sigma 655104), 10 µl DMEM 5X (Sigma D5523), 50 µl cell solution and 14.5 µl sterile water was prepared. Hydrogel mixture was injected into the microfluidic device using a micropipette and a 10 µl droplet was placed on top of the inlet to prevent hydrogel evaporation. Afterwards, the microfluidic device was placed into an incubator (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>) for 15 minutes to allow collagen polymerization. 5 ml of culture medium was added to cover all the microdevices attached to the Petri dish. Culture medium was perfused through the lateral microchannels to allow oxygen and nutrient diffusion. In all experiments, culture medium in the lateral microchannels was refreshed once a day by pipetting 10 µl through each lateral microchannel (unless otherwise stated). U-251 MG and HCT-116 cells were viable within the microdevice for all the different cell densities assessed after 6 days in cell culture. When a different culture medium (e.g. medium supplemented with drugs) was desired, culture medium was removed from the Petri dish

by aspiration, 5 ml of the new medium was added and 10  $\mu$ l were perfused through the lateral microchannels by manual pipetting.

#### **Cell proliferation measurement.**

Cell proliferation was observed in live cells using the Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor (Thermo, P36237). Briefly, cells were transduced using a 50 virus particle/cell ratio for 48 hours. Transduced cells were trypsinized and cultured in 3D within the microdevice as described above. This cell cycle sensor was transduced into the cells using two different reporters coupled to TagRFP or emGFP that are expressed alternatively during the G1 phase or the S/G2/M phases respectively.

#### **Cell viability analysis.**

Stock solutions of 5 mg/ml Calcein (CAM) (Life Technologies, C1430) and 2 mg/ml propidium iodide (PI) (Sigma P4170) were dissolved in DMSO and distilled water respectively. To test cell viability within microfluidic devices and in Petri dishes, stock solutions of CAM and PI were diluted to 5 and 4  $\mu$ g/ml, respectively, in phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza BE17-516F). CAM/PI solution was perfused through the lateral microchannels. Cells were visualized by confocal microscopy (Nikon Ti-E coupled to a C1 modular confocal microscope), with viable cells (CAM-positive) staining green and dead cells (PI-positive) staining red.

Cell viability profiles were evaluated by analysing the fluorescence intensity of the viable/dead cells across the central microchamber. All confocal images were taken at different focal planes with subsequent image analysis performed using FIJI software. DOX and PI naturally fluoresce red; therefore an alternative cell viability staining solution was used during DOX experiments: 50  $\mu$ l of NucGreen® Dead 488 ReadyProbes® Reagent (Life technologies, R37109) and 50  $\mu$ l of NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent (Life technologies, R37605) were added to 900  $\mu$ l of growth medium. This solution was perfused through the lateral channels, labelling all the cells in blue and dead cells in green.

#### **Drug penetration assays.**

In order to study the penetration of soluble drugs through the microdevice, a 1.2 mg/ml collagen hydrogel was confined in the central microchamber. After collagen polymerization, 100  $\mu$ M DOX, dissolved in culture medium, was injected through one lateral microchannel. Given the red fluorescence of DOX, confocal images were taken at different times to monitor the DOX penetration. Next, to determine whether the cells hinder the drug penetration, the experiment was repeated confining a collagen hydrogel with 40 million HCT-116 cells/ml embedded.

#### **Drug toxicity assays.**

HCT-116 cells were confined at 40 million cells/ml in a 1.2 mg/ml collagen hydrogel. After six hours in culture, 30  $\mu$ M DOX, dissolved in culture medium, was injected through both lateral microchannels. Cell viability was evaluated after 3 days in culture.

Prior to any study within the microdevices, the effect of TMZ and TPZ was evaluated on conventional Petri dishes. 50  $\mu$  M, 100  $\mu$  M and 200  $\mu$  M TMZ was assessed on U-251 MG cells cultured in 2D, as well as in 3D collagen hydrogels in Petri dishes. U-251 MG cells were incubated in the presence of TMZ and the total number of viable cells was determined after 1, 3 and 7 days. The effect of 1, 10 and 100  $\mu$  M TPZ on cell viability was evaluated in 3D collagen hydrogels in Petri dishes cultured under 20% or 1% O<sub>2</sub>. Cell viability was evaluated after 3 days.

U-251 MG cells were cultured at 40 million cells/ml embedded in a 1.2 mg/ml collagen hydrogel confined in the central microchamber. After six hours in culture, 100  $\mu$  M TMZ, 1.6  $\mu$ g/ml CPT-5-Ala or 100  $\mu$  M TPZ (all of them dissolved in culture medium) was injected through both lateral microchannels and cell viability was evaluated after 3 days.

### **Image analysis.**

Laser confocal and fluorescence images were acquired using a Nikon Eclipse Ti-E C1 confocal microscope. The microscope has a temperature and CO<sub>2</sub> controlled environmental chamber, enabling live cell and time-lapse imaging. Temperature and CO<sub>2</sub> were set at 37 °C and 5% respectively. Images were analyzed using Fiji® software (<http://fiji.sc/Fiji>). Fluorescence intensity across the central microchamber of the microdevice was quantified in the different experiments by selecting a rectangular region across the central microchamber. The fluorescence intensity across that section was then determined using the Fiji® software in accordance with the software instructions. In order to quantify cell proliferation, proliferating cells were manually counted in the different vertical regions of the central microchamber. In TMZ and TPZ experiments in Petri dishes, cell viability was determined by manual counting of viable and dead cells and calculating the percentage of viable cells relative to the total number of cells.

### **Statistical analysis.**

All the experiments were repeated at least three times as independent biological repeats. Drug toxicity study results are presented as the mean  $\pm$  standard error. The normal distribution was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . For nonparametric comparisons, a Kruskal-Wallis test was performed followed by the Mann-Whitney U-test.

### **References**

1. Whiteside, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27, 5904–5912, doi: 10.1038/ onc.2008.271 (2008).
2. Balkwill, F. R., Capasso, M. & Hagemann, T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science* 125, 5591–5596, doi: 10.1242/jcs.116392 (2012).
3. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 19, 1423–1437, doi: 10.1038/nm.3394 (2013).
4. Cantor, J. R. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery* 2, 881–898, doi: 10.1158/2159- 8290.CD-12-0345 (2012).
5. Brat, D. J. & Mapstone, T. B. Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Annals of internal medicine* 138, 659–668 (2003).
6. Junttila, M. R. & de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346–354, doi: 10.1038/nature12626 (2013).

7. Zhao, J. et al. The emerging role of hypoxia-inducible factor-2 involved in chemo/radioresistance in solid tumors. *Cancer treatment reviews* 41, 623–633, doi: 10.1016/j.ctrv.2015.05.004 (2015).
8. Chen, F. et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC medicine* 13, 45, doi: 10.1186/s12916-015-0278-7 (2015).
9. Xu, X., Farach-Carson, M. C. & Jia, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnology advances* 32, 1256–1268, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.07.009 (2014).
10. Nath, S. & Devi, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & therapeutics*, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013 (2016).
11. Bersini, S. & Moretti, M. 3D functional and perfusable microvascular networks for organotypic microfluidic models. *Journal of materials science. Materials in medicine* 26, 180, doi: 10.1007/s10856-015-5520-5 (2015).
12. Achilli, T. M., Meyer, J. & Morgan, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multicellular spheroids. *Expert opinion on biological therapy* 12, 1347–1360, doi: 10.1517/14712598.2012.707181 (2012).
13. Lorenzo, C. et al. Live cell division dynamics monitoring in 3D large spheroid tumor models using light sheet microscopy. *Cell division* 6, 22, doi: 10.1186/1747-1028-6-22 (2011).
14. McMahan, K. M. et al. Characterization of changes in the proteome in different regions of 3D multicell tumor spheroids. *Journal of proteome research* 11, 2863–2875, doi: 10.1021/pr2012472 (2012).
15. le Roux, L. et al. Optimizing imaging of three-dimensional multicellular tumor spheroids with fluorescent reporter proteins using confocal microscopy. *Molecular imaging* 7, 214–221 (2008).
16. Pampaloni, F., Richa, R., Ansari, N. & Stelzer, E. H. Live spheroid formation recorded with light sheet-based fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol* 1251, 43–57, doi: 10.1007/978-1-4939-2080-8\_3 (2015).
17. Menon, N. V., Chuah, Y. J., Cao, B., Lim, M. & Kang, Y. A microfluidic co-culture system to monitor tumor-stromal interactions on a chip. *Biomicrofluidics* 8, 064118, doi: 10.1063/1.4903762 (2014).
18. Moussavi-Harami, S. F., Pezzi, H. M., Huttenlocher, A. & Beebe, D. J. Simple microfluidic device for studying chemotaxis in response to dual gradients. *Biomedical microdevices* 17, 9955, doi: 10.1007/s10544-015-9955-8 (2015).
19. Zervantonakis, I. K. et al. Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13515–13520, doi: 10.1073/pnas.1210182109 (2012).
20. Stroock, A. D. & Fischbach, C. Microfluidic culture models of tumor angiogenesis. *Tissue engineering. Part A* 16, 2143–2146, doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0689 (2010).
21. Esch, E. W., Bahinski, A. & Huh, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 14, 248–260, doi: 10.1038/nrd4539 (2015).
22. Ayuso, J. M. et al. Study of the Chemotactic Response of Multicellular Spheroids in a Microfluidic Device. *PloS one* 10, e0139515, doi: 10.1371/journal.pone.0139515 (2015).
23. Ayuso, J. M. et al. SU-8 based microdevices to study self-induced chemotaxis in 3D microenvironments. *Front Mater* 2, 37, doi:10.3389/fmats.2015.00037 (2015).
24. Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* 507, 181–189, doi: 10.1038/nature13118 (2014).
25. Minchinton, A. I. & Tannock, I. F. Drug penetration in solid tumours. *Nature reviews. Cancer* 6, 583–592, doi: 10.1038/nrc1893 (2006).
26. Chung, S. et al. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab on a chip* 9, 269–275, doi:10.1039/b807585a (2009).
27. Funamoto, K. et al. A novel microfluidic platform for high-resolution imaging of a three-dimensional cell culture under a controlled hypoxic environment. *Lab on a chip* 12, 4855–4863, doi: 10.1039/c2lc40306d (2012).

28. Moreno, L. & Pearson, A. D. J. How can attrition rates be reduced in cancer drug discovery? *Expert Opin Drug Dis* 8, 363–368, doi:10.1517/17460441.2013.768984 (2013).
29. Tonkens, R. An overview of the drug development process. *Physician executive* 31, 48–52 (2005).
30. Okon, I. S. & Zou, M. H. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 100, 170–174, doi: 10.1016/j.phrs.2015.06.013 (2015).
31. Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature reviews. Cancer* 14, 709–721, doi: 10.1038/nrc3803 (2014).
32. Tannock, I. F., Lee, C. M., Tunggai, J. K., Cowan, D. S. & Egorin, M. J. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 878–884 (2002).
33. Curnis, F., Sacchi, A. & Corti, A. Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *The Journal of clinical investigation* 110, 475–482, doi: 10.1172/JCI15223 (2002).
34. Sanchez-Martinez, D. et al. Human NK cells activated by EBV lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *Oncoimmunology* 4, e991613, doi: 10.4161/2162402X.2014.991613 (2015).
35. Morfoisse, F. et al. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 $\alpha$ -independent translation mediated mechanism. *Cell reports* 6, 155–167, doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.011 (2014).

#### **Acknowledgements**

We would like to thank Dr AC Prats for providing the lentivectors and her advice during the cell transduction. This work has been supported by the Spanish national research program (BIO2016-79092-R, DPI2011- 28262-c04-01, DPI2015-65401-C3-1-R, MTM2012-31073 and MAT2015-69967-C3-1 grants). J.M.A. studentship was supported by the Aragon Government. M.V. and A.L. studentships were supported by the Spanish national government.

#### **Author Contributions**

J.M.A., S.J.A., R.M.P., L.J.F. and I.O. contributed to idea generation and completion of this work. J.M.A., M.V.-M., A.L., P.M.L. and E.C.-C. performed the experiments. P.B. and E.C.-C. synthesized the CPT-5-ALA. J.M.A., A.L. and M.V.-M. analysed the data. All the authors contributed to writing and reviewing the manuscript.



# **Anexo II: Protocolo de Morton & Griffiths**





Los procedimientos experimentales que conllevan una severidad media o alta deben incluir un Protocolo de Supervisión de los Animales que permita cuantificar su dolor y bienestar. De esta manera se podrán aplicar a los animales medidas paliativas del dolor o considerar la eutanasia por motivos éticos si fuera necesario de una forma controlada y objetiva. Uno de los Protocolos más extendidos es el de Morton y Griffiths [85] cuyas puntuaciones y variables se encuentran en la **Figura A3.1**.

### PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN

|  | Variables y puntuación   |          |
|--|--|----------|
| <b>Pérdida de Peso<br/>(0-3)</b>                               | <b>Sin pérdida de peso</b>   | <b>0</b> |
|  | Pérdida de peso <b>1-10%</b>   | <b>1</b> |
|  | Pérdida de peso entre <b>10-20%</b> . Diarrea o alteración en las heces  | <b>2</b> |
|  | Pérdida de peso <b>&gt;20%</b> . El animal no consume agua o alimento.   | <b>3</b> |
| <b>Aspecto<br/>(0-3)</b>                                       | <b>Sin alteraciones</b>  | <b>0</b> |
|  | <b>Pelo mal estado</b>   | <b>1</b> |
|  | <b>Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares y nasales</b>  | <b>2</b> |
|  | <b>Posición anormal</b>  | <b>3</b> |
| <b>Comportamiento espontáneo<br/>(0-3)</b>                     | <b>Sin alteraciones</b>  | <b>0</b> |
|  | <b>Cambios leves en el comportamiento</b>  | <b>1</b> |
|  | <b>Inactividad del animal</b>  | <b>2</b> |
|  | <b>Automutilación, vocalizaciones anormales, animales muy inquietos o inmóviles</b>                                | <b>3</b> |
| <b>Comportamiento en respuesta a la manipulación<br/>(0-3)</b> | <b>Sin alteraciones</b>  | <b>0</b> |
|  | <b>Cambios leves en el comportamiento</b>  | <b>1</b> |
|  | <b>Cambios moderados en el comportamiento</b>  | <b>2</b> |
|  | <b>Comportamiento agresivo o animal comatoso</b>   | <b>3</b> |
| <b>Constantes vitales<br/>(0-3)</b>                            | <b>Sin alteraciones</b>  | <b>0</b> |
|  | <b>Pequeños cambios en Temperatura o frecuencia cardíaca</b>   | <b>1</b> |
|  | <b>Variaciones en la Temperatura corporal de 1-2°C, aumento del 30% en la frecuencia cardíaca o respiratoria</b>   | <b>2</b> |
|  | <b>Variaciones en la Temperatura corporal de &gt;2°C, aumento del 50% en la frecuencia cardíaca o respiratoria</b> | <b>3</b> |

**Puntuación total:** \_\_\_\_ (puntuación de 0 a 20).

**Nota:** Cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro, los 3 pasan a puntuar 4.

Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:

De 0-4: Animal Normal en buen estado

De 5-9: Supervisar cuidadosamente al animal. Valorar la administración de analgésicos

De 10-14: Sufrimiento intenso del animal. Administrar analgésicos y valorar la eutanasia del animal.

De 15-20: Eutanasia del animal. Suprimir el procedimiento experimental.

