

Ensayos de quimiosensibilidad en cultivos primarios de tumores cerebrales

J.L. Gil-Salú; J. Bosco-López*; M. Domínguez-Villar*; I. Domínguez-Pascual; J. Pérez-Requena**; M.J. Palomo** y M. López-Escobar

Servicios de Neurocirugía, Unidad Investigación y **Anatomía Patológica. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz. *Medicina Interna y Unidad Investigación. Hospital Clínico de Puerto Real. Cádiz.

Resumen

Durante los últimos 50 años la quimioterapia (QT) ha jugado un importante papel en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el éxito o fracaso de nuevas drogas para un determinado tipo de cáncer es difícil de predecir. La quimiosensibilidad *in vitro* es un método atractivo para conocer *a priori* si ese tumor responderá a una pauta de QT y para determinar la dosis óptima de tratamiento en los enfermos con cáncer.

Objetivo. Conocer la sensibilidad de tumores cerebrales frente a determinados fármacos antineoplásicos.

Material y métodos. Se ensayaron 5 fármacos diferentes (carmustina, camptotecina, taxol, hidroxiurea y tamoxifeno) en los cultivos primarios obtenidos de 7 pacientes con glioblastoma multiforme, 15 pacientes con meningiomas y un paciente con meduloblastoma. Para estudiar la quimiosensibilidad se empleó el test del MTT, midiendo la densidad óptica por espectrofotometría a 450 nm.

Resultados. Un total de 49 mediciones fueron realizadas, obteniendo 44 curvas dosis-respuesta válidas. Se emplearon concentraciones desde 10^{-2} M hasta 10^{-12} M para cada fármaco ensayado, obteniendo IC50 en cada caso como valor representativo de la sensibilidad del tumor a la droga.

Conclusiones. El test MTT se muestra válido para medir la quimiosensibilidad *in vitro* de tumores cerebrales a nuevos fármacos.

PALABRAS CLAVE: Tumores cerebrales. Cultivos celulares. Quimiosensibilidad. Test MTT.

Chemosensitivity test on brain tumors

Summary

During last 50 years chemotherapy has played a very important part in the cancer treatment. Howe-

ver, succes or failures of news drugs in one particular cancer its dif.cult to predict. *In vitro* chemosensitivity is an attractive method for knowing about responses of a tumor to ChT treatment and assess the best dose in the patient with cancer.

Objective. To know brain tumors sensitivity against antineoplastic drugs.

Methods. Five different drugs (carmustin, camptotecin, taxol, hydroxyurea and tamoxifen) were tested on short-term cultures from 7 patients with Glioblastoma multiforme, 15 patients with meningiomas and one patient with meduloblastoma. For testing chemosensitivity we used MTT assay, and we measured optic density by spectrophotometry to 450 nm.

Results. A total of 49 measurement were done, getting 44 valids dose-result curves. For each drug we used from 10^{-2} M to 10^{-12} M gap, and IC50 result was representative of tumor sensitivity to the drug.

Conclusion. our data support MTT assays like valid method for measuring *in vitro* chemosensitivity in brain tumors to news drugs.

KEY WORDS: Brain tumors. Cell culture. Chemosensitivity. MTT assay.

Introducción

El empleo de fármacos antineoplásicos es un método de tratamiento, principal o complementario, ampliamente aceptado en muchos tumores cerebrales. Como agentes citotóxicos sirven para prolongar la supervivencia de los pacientes en determinados tipos tumorales. Sin embargo, otros tumores se muestran quimiorresistentes, por ejemplo el glioblastoma multiforme (GM), o es interesante valorar en ellos el papel citorreductor de nuevas drogas, por ejemplo en los meningiomas.

La elección última de la quimioterapia a emplear en el paciente que sufre de un tumor cerebral depende de múltiples factores: la sensibilidad de las células del tumor a las drogas testadas *in vitro* o *in vivo*; la penetrabilidad del fármaco en el sistema nervioso central, atravesando la

barrera hematoencefálica; el índice terapéutico o relación entre la eficacia/toxicidad a las concentraciones empleadas y la farmacocinética del agente citotóxico¹².

El primero de estos factores está condicionado por las características genéticas del tumor⁹ y, de las mismas, depende la quimiosensibilidad o quimiorresistencia que presente cuando lo valoremos *in vitro* (en medios de cultivo) o *in vivo* (modelos animales, valoración clínico-radiológica en pacientes)¹⁶.

Los métodos que se emplean inicialmente para descubrir la utilidad, y el posterior desarrollo, de un fármaco antineoplásico emplean los cultivos celulares y después los modelos animales en roedores como banco de pruebas. Frente a los cultivos de células tumorales obtenidos por múltiples pases y selección de clones, con una características muy definidas, los cultivos primarios aportan la ventaja de mostrarnos una población de células tumorales heterogénea y ser representativos del paciente a tratar^{1,8,20}.

Con el propósito de valorar la utilidad que los cultivos primarios de tumores cerebrales tienen como banco de pruebas, hemos demostrado anteriormente que son representativos del tumor del que proceden, reproduciendo *in vitro* las características citológicas e inmunohistoquímicas que en la parafina se demuestran¹⁰. Conseguido esto, nos proponemos analizar si el test del MTT (3-4,5 dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazol blue) es válido para mostrar si hay respuesta a un determinado quimioterápico y a qué concentraciones se obtienen las inhibiciones del crecimiento celular tumoral al 50% (IC50) en cultivos primarios de tumores cerebrales.

Material y método

Preparación del cultivo primario

La obtención del cultivo primario se inicia en el quirófano, con una adecuada toma de la muestra tumoral, unos 4 cc., intentando no fragmentarla, y tomándola de una zona que creamos sea representativa del tumor, evitando por ejemplo áreas de necrosis. Su procesado inmediato lo llevamos a cabo en la Unidad de Investigación de nuestro centro donde, manipulando siempre las muestras en campanas de flujo laminar, se procedía a trocear la muestra, sometiéndola a una digestión enzimática con colagenasa tipo I-a, a 37° C durante 90 minutos, en un frasco de Roux con 50 cc de medio de cultivo de Dubelco (DMEM). Posteriormente recogíamos el sobrenadante que centrifugamos a 1600 rpm a 4° C durante 7 minutos. El "pellet" o producto de células resultantes era recogido empleando 5 cc de medio de cultivo completo (MCC) (para 5cc: 4.25 cc de DMEM; 50 microlitros de glutamina; 600 microlitros de suero de ternera fetal; 100 microlitros de una solución antibiótica: cloxaciclina, gentamicina y ampicilina), depositándola en un frasco de cultivo que se conservaba en posición hori-

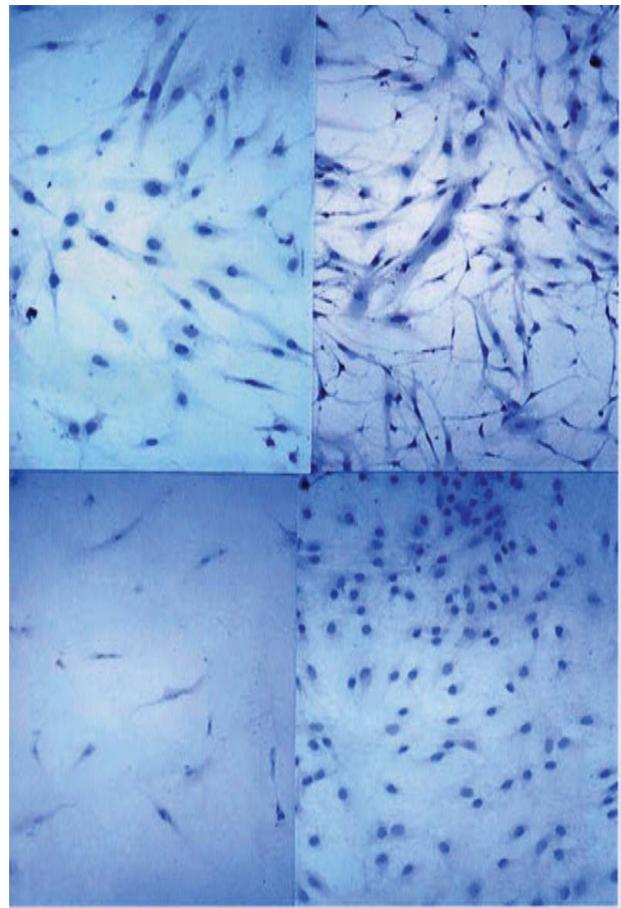


Figura 1. Cultivos primarios de distintos tumores cerebrales en monocapa.

zontal a 37° C en un ambiente con 5% de CO₂ durante los días siguientes. En el microscopio de contraste de fases se vigilaba diariamente el crecimiento de las células en cultivo, renovándose cada 4 días el MCC hasta observar el tapizamiento de la superficie del frasco por las células en cultivo en monocapa (Figura 1). En ese momento se procedía a "levantar" las células de la superficie del frasco empleando tripsina, 5 minutos a 37° C en ambiente con 5% de CO₂, y luego se neutraliza con suero de ternera fetal, en cantidades equivalentes, y se centrifuga a 1600 rpm a 4° C durante 7 minutos, hasta obtener un "pellet" de las células en suspensión¹⁰.

Realización del test de MTT

El "pellet" de células es suspendido con DMEM y con la nueva suspensión se llenan los pocillos de una cámara de 96, en la que despreciamos las filas y columnas de los extremos, asignando a cada columna una concentración progresivamente creciente del fármaco a testar (desde 10⁻² hasta 10⁻¹² M). Dejamos la cámara en estufa hasta observar el nuevo tapizamiento del fondo (Figura 2).

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3071554>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3071554>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)