

Establecimiento de la línea PL104

Modelo de estudio del balance muerte/sobrevida de células tumorales

► Victoria Cavaliere^{1*}, Ariel Glickman^{2*}, Liliana Solari^{3**}, Daniel Gammella^{3**}, Silvia Hajos^{4*}, Élica Álvarez^{5*}

-
1. Bioquímica, estudiante de doctorado de la Universidad de Buenos Aires. Ayudante de 1era.
 2. Becario-estudiante.
 3. Bioquímico.
 4. Dra. en Bioquímica. Investigador del CONICET. Prof. Titular Plenario.
 5. Dra. en Bioquímica. Investigador del CONICET. Prof. Adjunto.

* Cátedra de Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), UBA-CONICET.

** Sección Bioquímica de Estudios Especiales. Laboratorio de Citometría de Flujo. Hospital Prof. Dr. Alejandro Posadas. Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La apoptosis es un proceso fisiológico crítico para el crecimiento celular, regulado por factores pro y anti-apoptóticos. Defectos en su control llevan a una ventaja selectiva en la sobrevida celular favoreciendo el desarrollo de patologías neoplásicas. NFκB puede promover la proliferación celular por lo que el uso de inhibidores selectivos lleva a un aumento de la apoptosis. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la línea celular PL104, obtenida de células de punción de médula ósea de una paciente con diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) atípica y evaluar la susceptibilidad de la misma frente a los quimioterápicos Doxorubicina (DOX), Vincristina (VCR), Gemcitabina e inhibidores de NFκB, CAPE y MG-132. El fenotipo evaluado por citometría de flujo resultó positivo para CD19, CD20, CD22, CD38, CD45, CD79a, HLA-DR y cadena lambda con expresión aberrante de CD71. Se verificó el efecto de los agentes mencionados sobre la proliferación celular resultando a las 24 h en un $5.2 \pm 0.7\%$, $42.8 \pm 3.6\%$, $2.4 \pm 0.4\%$, $0.7 \pm 0.2\%$ y $0.7 \pm 0.3\%$ ($p < 0.001$) de sobrevida celular para DOX (4 μM), VCR (10 μM), Gemcitabina (0.04 μM), CAPE (360 μM) y MG-132 (4 μM), respectivamente. La apoptosis evaluada con bromuro de etidio-naranja de acridina para DOX (1.5 μM), VCR (1 μM), CAPE (360 μM) y MG-132 (4 μM) a las 24 h fue de $28.9 \pm 1.9\%$, $47 \pm 2.7\%$, $77.1 \pm 5.7\%$ y $92.8 \pm 2.9\%$ ($p < 0.001$) respectivamente vs. $6.6 \pm 0.2\%$ para las células sin tratar, datos confirmados por Annexin-V. Se concluye que la línea PL104 derivada de una LMA corresponde a linfocitos B sensibles tanto a la acción de los quimioterápicos testeados como a los inhibidores de NFκB, lo que indica la implicancia de dicho factor en la sobrevida de estas células.

Palabras clave: leucemia mieloide aguda * apoptosis * factor de transcripción nuclear κB * doxorubicina * vincristina * gemcitabina * ácido cafein fenil etil éster * MG-132

Summary

ESTABLISHMENT OF PL104 CELL LINE. MODEL FOR THE STUDY OF THE SURVIVAL/DEATH BALANCE OF TUMOUR CELLS

Apoptosis is a physiological process regulated by a delicate balance between pro and anti-apoptotic factors, which plays a critical role in cell growth. Defects in its balance may lead to a selective advantage in cell survival that

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

promotes neoplasia and malignancy. NFkB enhances cell proliferation thus, the use of selective inhibitors induces apoptosis. The aim of the present study was to characterise the cell line PL104 obtained in this laboratory from bone marrow cells of a young patient with an atypical acute myeloid leukaemia (AML) and to evaluate its susceptibility against the chemotherapeutic agents Doxorubicine (DOX), Vincristine (VCR) Gemcitabine and the inhibitors of NFkB, CAPE and MG-132. PL104 phenotype, evaluated by flow cytometry, showed expression of the following markers: CD19, CD20, CD22, CD38, CD45, CD79a, HLA-DR and lambda chain plus aberrant expression of CD71. The effect of these compounds on cell proliferation was evaluated resulting in $5.2 \pm 0.7\%$, $42.8 \pm 3.6\%$, $2.4 \pm 0.4\%$, $0.7 \pm 0.2\%$ and $0.7 \pm 0.3\%$ ($p < 0.001$) of cell growth for DOX ($4 \mu\text{M}$), VCR ($10 \mu\text{M}$), Gemcitabine ($0.04 \mu\text{M}$), CAPE ($360 \mu\text{M}$) and MG-132 ($4 \mu\text{M}$) respectively after 24 h of treatment. Apoptosis assessed by acridine orange and ethidium bromide staining after 24 h showed $28.9 \pm 1.9\%$, $47 \pm 2.7\%$, $77.1 \pm 5.7\%$ and $92.8 \pm 2.9\%$ ($p < 0.001$) for DOX ($1.5 \mu\text{M}$), VCR ($1 \mu\text{M}$), CAPE ($360 \mu\text{M}$) and MG-132 ($4 \mu\text{M}$) respectively versus $6.63 \pm 0.2\%$ for untreated cells, data confirmed by Annexin-V test. It can be concluded that the cell line PL104, originated from an AML, corresponds to B lymphocytes significantly susceptible to the chemotherapeutic agents and inhibitors tested. Therefore, NFkB's implication in controlling these cells' survival has been demonstrated.

Key words: *acute myeloid leukemia * apoptosis * nuclear transcription factor kB * doxorubicine * vincristine * gemcitabine * caffeic acid phenylethyl ester * MG-132*

Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) se caracteriza por la acumulación de células mieloides inmaduras en médula ósea, sangre periférica y otros órganos, acompañada de una supresión de la hematopoyesis normal. Es una enfermedad altamente heterogénea, razón por la cual se han definido varios subtipos histológicos (M0 a M7 según la clasificación FAB: Franco-Americana-Británica) con alta prevalencia en la población infantil. Los signos y síntomas clínicos observados están estrechamente relacionados con la infiltración de los tejidos por las células leucémicas y el fracaso de la hematopoyesis antes mencionado.

El diagnóstico de las distintas clases de leucemia es posible gracias a la contribución y aporte conjunto de variadas metodologías entre las que cabe destacar la evaluación del cuadro clínico, el examen de la morfología celular, acompañado del análisis citogenético-molecular y la inmunofenotipificación. Esta última permite analizar selectivamente las subpoblaciones celulares haciendo uso de un panel de anticuerpos monoclonales que permiten identificar la línea específica de origen de las células leucémicas y su nivel de maduración (1).

La LMA es la resultante de alteraciones genéticas, algunas de las cuales conducen a la expresión de proteínas de fusión que actúan como nuevos factores de transcripción celular (2)(3). El producto de fusión se comporta como un neo-factor responsable del bloqueo del proceso normal de diferenciación mieloide (4). Sin

embargo, datos obtenidos a partir de modelos animales demuestran que la sola expresión de estos neo-factores de transcripción no sería suficiente para iniciar la leuquemogénesis (5). Puede así sugerirse que tanto las proteínas de fusión mencionadas como alteraciones en señales de supervivencia y crecimiento celular cooperan y contribuyen para generar el fenotipo transformado (6).

La apoptosis constituye un mecanismo fisiológico intrínseco de muerte celular programada que juega un rol crítico en la homeostasis tisular, especialmente de aquellos órganos con una alta tasa diaria de producción y recambio celular (7). La disregulación de este mecanismo estaría involucrada en la carcinogénesis posibilitando un aumento aberrante de la tasa de proliferación celular, una acumulación de mutaciones transformantes y promoviendo la resistencia a la vigilancia inmunológica (8). Defectos en las vías apoptóticas constituyen la causa más importante de fallas en el tratamiento de leucemias siendo responsables de la emergencia de resistencia a multidroga (9) y disminuyendo la eficacia de la quimioterapia utilizada. De lo antes expuesto surge que aquellos compuestos capaces de superar los defectos o bloqueos en las vías pro-apoptóticas son de elección al momento del diseño de la estrategia terapéutica a seguir.

La activación constitutiva del factor de transcripción nuclear NFkB ha sido descrita en varias líneas celulares malignas que incluyen leucemias linfoides así como también en muestras obtenidas a partir de pacientes (10)(11). La forma activa de este factor pro-

mueve la actividad antiapoptótica (12) y es necesaria para la supervivencia de células transformadas (13) por lo que su regulación negativa o inhibición puede sensibilizar a la célula hacia una muerte programada. Entre los genes blanco de NFκB, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) han emergido como un factor crítico para las señales de supervivencia (14) a través de su capacidad de inhibir directamente caspasas específicas evadiendo de este modo las señales apoptóticas (15). Dado el rol central de NFκB como regulador transcripcional, su expresión tanto en LMA como LLA representa una diferencia biológica significativa entre el tejido normal y el leucémico (11).

En el presente estudio se describe la obtención de una línea celular a partir de células leucémicas de médula ósea derivadas de una paciente que presentó un desorden en la diferenciación del linaje mielóide. Se realizó la caracterización por inmunofenotipificación y se analizó la sensibilidad de la misma frente a agentes quimioterápicos y al bloqueo de la vía de señalización de NFκB. Los resultados encontrados muestran que la línea celular PL104 pertenece al linaje de linfocitos B sensibles a la acción de Vincristina, Doxorubicina y Gemcitabina, cuya supervivencia es altamente dependiente de la vía de señalización mediada por NFκB.

Materiales y Métodos

MATERIALES

CAPE (ácido cafein fenil etil éster) y MG-132 fueron adquiridos a EMB Biosciences, Inc., (San Diego, California). Vincristina (VCR) fue provista gentilmente por Filaxis S.A. Argentina, Doxorubicina (DOX) por Gador y Gemcitabina por Laboratorios Richmond. RPMI-1640, Penicilina y Streptomycin se obtuvieron de Invitrogen Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina).

MUESTRA CLÍNICA

Se utilizó una punción de médula ósea de una paciente de sexo femenino, de 14 años de edad proveniente del Servicio de Oncohematología Pediátrica del Hospital Dr. A. Posadas, bajo las normas éticas de la declaración de Helsinki. La paciente llegó a la consulta presentando esplenomegalia palpable y leucocitosis por lo que se estableció un diagnóstico presuntivo de LMC. El posterior análisis citogenético-molecular y la inmunofenotipificación diagnosticaron una LMA atípica, tras lo cual recibió una primera inducción con el protocolo actual para LMA (Ara C, Idarubicina y Etoposido), una segunda inducción con protocolo HAM (altas dosis de Ara C y Metoxantrone) seguida de ciclos de consolidación con Ara C e Idarubicina. La paciente

se mostró refractaria a los tratamientos empleados sin poder alcanzarse la remisión.

LÍNEAS CELULARES

La línea celular PL104 fue obtenida en este laboratorio. Las células recuperadas de la punción medular fueron cultivadas con RPMI-1640 suplementado con 20% de suero bovino fetal inactivado, 2 mM L-glutamina, 20 mM *buffer* Hepes, penicilina 100 µg mL⁻¹, streptomycin 150 µg mL⁻¹ y 2-mercaptoetanol 50 µM, en atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN

El análisis de los antígenos de superficie fue realizado por citometría de flujo de tres colores utilizando anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados a ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) y/o pteridinoclorofila (PerCP) de acuerdo a lo descrito previamente (16). Los resultados se obtuvieron realizando una ventana (*gate*) en la población de interés usando el *side scatter* (SSC) versus *forward light scatter* (FSC) y examinando la expresión asociada de FITC/PE/PerCP. Se utilizaron los siguientes AcMo: anti CD3, CD19, CD34, CD45 (PerCP); CD8, CD10, CD15, CD16, CD20, CD41a, CD64, HLA-DR, mieloperoxidasa, cadena *kappa* (FITC); CD4, CD11b, CD13, CD14, CD22, CD33, CD38, CD56, CD79a, CD117, cadena *lambda* (PE) provistos por Becton Dickinson. Las células (5x10⁵ cél/mL) se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min con los AcMo en concentraciones de saturación y luego de un lavado con PBS se resuspendieron en 0.5 mL de *buffer*. El análisis fue realizado en un citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson (L.A., California) utilizando el *software* Cell Quest™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, L.A., California).

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Las células tumorales PL104 (5x10⁵ cél/mL) fueron cultivadas en presencia de los distintos quimioterápicos DOX, VCR y Gemcitabina o inhibidores de la vía NFκB CAPE y MG-132 durante 24 y 48 h a 37 °C y 5% de CO₂ a distintas concentraciones (DOX: 0.5, 1, 1.5, y 2 µM, VCR: 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 µM, Gemcitabina: 0.003, 0.0045, 0.009, 0.02 y 0.04 µM, CAPE: 90, 180 y 360 µM, MG-132: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 µM). Los cultivos fueron pulsados con 1 µCi de ³H-timidina/pocillo (Du Pont, NEN Products, Boston, MA, USA) y mantenidos por 18 h previas a la cosecha. La incorporación de [³H]TdR fue medida en un contador beta de centelleo líquido (Beckman, MD, USA) obteniéndose la media de las cpm de [³H]TdR incorporada al cultivo por triplicado (17). Finalmente, el porcentaje de supervivencia fue calculado como:

Sobrevida % = (cpm cél trat /cpm cél sin tratar) x 100

Cada experimento se repitió al menos tres veces. Las células no tratadas corresponden al 100% de sobrevivencia. El porcentaje de células viables al inicio del experimento fue de 95 - 98% determinado por el *test* de exclusión con Azul Tripán.

DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Para determinar el porcentaje de apoptosis celular se realizó un análisis de la morfología celular mediante la coloración con bromuro de etidio-naranja de acridina (18). Brevemente, luego de 6, 15 y 24 h de tratamiento con los quimioterápicos o inhibidores (DOX: 0.5, 1, 1.5, y 2 μ M, VCR: 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 μ M, CAPE: 90, 180 y 360 μ M, MG-132: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 μ M) se resuspendieron los *pellets* celulares (5×10^6 céls/mL) en 2 μ L de la mezcla de colorantes (1 mg/mL naranja de acridina más 1 mg/mL bromuro de etidio en PBS) y se observaron en un microscopio de epi fluorescencia (Carl Zeiss, Alemania). Se contabilizó un número mínimo de 200 células con fragmentación nuclear, aumento del citoplasma y una apreciable condensación de la cromatina.

El porcentaje de células apoptóticas fue calculado como:

$$\text{Apoptosis \%} = (\text{N}^\circ \text{ total de cél con núcleos apoptóticos} / \text{N}^\circ \text{ total de céls}) \times 100$$

Al menos 200 células fueron contadas para determinar el porcentaje de células apoptóticas.

Para el método de Annexin-V, las células (1×10^6 cél/mL) sometidas a los distintos tratamientos por 24 h fueron resuspendidas en *buffer binding* y luego se adicionaron Annexin V-FITC más yoduro de propidio (19). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACScan. Los datos fueron evaluados utilizando el *software* WinMDI 2.8 (Scripps Institute, La Jolla, CA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados utilizando el *software* Graph Pad PRISM™ (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). Se aplicó el método de ANOVA y posteriormente el *test* de Tukey para comparaciones entre grupos. Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos con $p < 0.05$, $** < 0.01$ y $*** < 0.001$.

Resultados

INMUNOFENOTIPIFICACIÓN

La línea celular PL104, establecida luego de 30 pasajes, crece en suspensión formando grumos y se mantiene por repiques cada 72 h con RPMI adicionado de

10% de SFB inactivado. Actualmente se la utiliza entre los repiques 40 - 50.

El análisis de la expresión de los marcadores de superficie se realizó en paralelo para diferentes muestras de la paciente como para las células mantenidas en cultivo a distintos tiempos correspondientes a los pasajes 35 (Abr-05) y 48 (Jun-05). Como se puede observar en la Tabla I, las muestras de la paciente presentan los marcadores CD7, CD11b, CD13, CD33, CD34, CD117 y mieloperoxidasa que no se evidencian en las células en cultivo. Tanto las muestras de la paciente como la línea celular obtenida comparten la expresión de CD22, CD38, CD45 y HLA DR. La línea en cultivo adquirió marcadores propios que corresponden a CD19, CD20, CD79a y cadena *lambda*, característicos de linaje B. De manera interesante la línea PL104 presenta una expresión aberrante del marcador CD71.

EFFECTO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS E INHIBIDORES DE NFkB SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA PL104

Con el fin de determinar la sensibilidad de las células a la acción de quimioterápicos utilizados en el tratamiento de leucemias, se analizó el efecto de dosis crecientes de DOX, VCR y Gemcitabina sobre la proliferación celular a las 24 y 48 h de cultivo. Como se observa en la Fig. 1 A y B, las drogas DOX y VCR ejercen un marcado efecto inhibitorio de la proliferación celular en todas las dosis testeadas. La línea resultó ser más sensible a la acción de DOX ya que a las 24 h de tratamiento se alcanza un nivel de inhibición superior al 85% a partir de 1.5 μ M. Además, se analizó el efecto de Gemcitabina, droga de elección en el tratamiento del carcinoma de páncreas, sobre la proliferación de las células PL104. Como se observa en la Fig. 1 C este agente también fue capaz de inhibir el crecimiento celular en forma dosis-dependiente.

Para verificar si la sobrevivencia celular era dependiente de la vía de señalización de NFkB se utilizaron los inhibidores CAPE (ácido cafein fenil éster) y MG-132; como se observa en la Fig 1, D y E, ambos tratamientos produjeron una significativa inhibición del crecimiento celular de manera dosis y tiempo-dependiente indicando que la sobrevivencia celular es dependiente de la vía de activación de NFkB.

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Para determinar si el efecto antiproliferativo ejercido por los quimioterápicos está mediado por la inducción de apoptosis, se determinó el porcentaje de células apoptóticas luego del tratamiento con las distintas drogas por análisis morfológico y unión de Annexin V. Como puede observarse en la Fig. 2 A, ninguna de las dosis de DOX utilizadas fue capaz de inducir la apop-

Marcadores	Línea celular			Paciente		
	Abr-05	Jun-05	Nov-04	Dic-04	Mar-05	May-05
CD2	-	X	X	X	X	X
CD3	-	-	-	-	X	X
CD4	X	-	X	X	X	X
CD5	-	X	X	X	X	X
CD7	-	-	-	41%	40%	36%
CD8	X	-	X	X	X	X
CD10	-	-	-	-	X	X
CD11b	-	-	X	X	-	77%
CD13	X	-	92%	66%	43%	78%
CD14	-	-	X	-	-	X
CD15	-	15%	-	-	X	X
CD16	-	-	X	X	X	X
CD19	21-30%	69%	-	-	X	X
CD20	21-30%	97%	X	X	X	X
CD22	X	99%	32%	X	X	X
CD33	-	6%	87%	98%	63%	100%
CD34	-	-	63%	83%	X	-
CD38	X	88%	X	X	+	93%
CD45	25-30%	80%	bi	bi	bi	bi
CD41a	X	-	X	X	X	-
CD56	-	-	X	X	X	X
CD64	-	-	X	-	-	X
CD79a	X	70%	X	-	X	X
HLADR	25-30%	88%	53%	95%	73%	-
CD71	X	80%	bi	X	bi	-
CD117	X	-	55%	X	36%	-
MIELOPER.	X	-	X	20%	17%	X
kappa	X	-	X	X	X	X
lambda	X	58%	X	X	X	X

X no se realizó - negativo + positivo bi baja intensidad

Tabla I. Análisis comparativo de la expresión de marcadores de superficie de la línea celular PL104 [Pasajes 35 (Abr-05) y 48 (Jun-05)] y de la paciente a lo largo del tiempo. Se muestran los porcentajes de positividad obtenidos para cada marcador luego del análisis por citometría de flujo.

tosis de las células a las 6 h de tratamiento mientras que a partir de las 15 h todas las concentraciones analizadas indujeron la muerte celular en forma significativa. En el caso del tratamiento durante 6 h con VCR (Fig. 2 B), puede observarse que sólo a partir de la dosis de 1 μ M se logra inducir apreciablemente la muerte celular; en cambio a las 15 y 24 h todas las dosis resultaron efectivas de manera tiempo-dependiente.

La Fig. 3, A y B, muestra el efecto de los inhibidores de NF κ B sobre la apoptosis de las células PL104. Sólo la máxima dosis de CAPE logró inducir significativamente apoptosis a las 6 h mientras que a ese mismo tiempo también lo hicieron las dosis de 2, 4 y 8 μ M de MG-132. Ambos inhibidores analizados mostraron un efecto do-

sis-tiempo dependiente. Los resultados obtenidos por marcación con Annexin V-FITC y posterior análisis por citometría de flujo mostraron correlación con los hallados por análisis morfológico (Fig. 2 C y 3 C).

Discusión y Conclusiones

La tumorigénesis es un proceso con múltiples etapas que comienza con la transformación celular seguido de hiperproliferación y finalmente la adquisición de capacidad invasiva lo que lleva al establecimiento de metástasis (20). No cabe duda que la proliferación descontrolada de un tejido es esencial para el desarro-

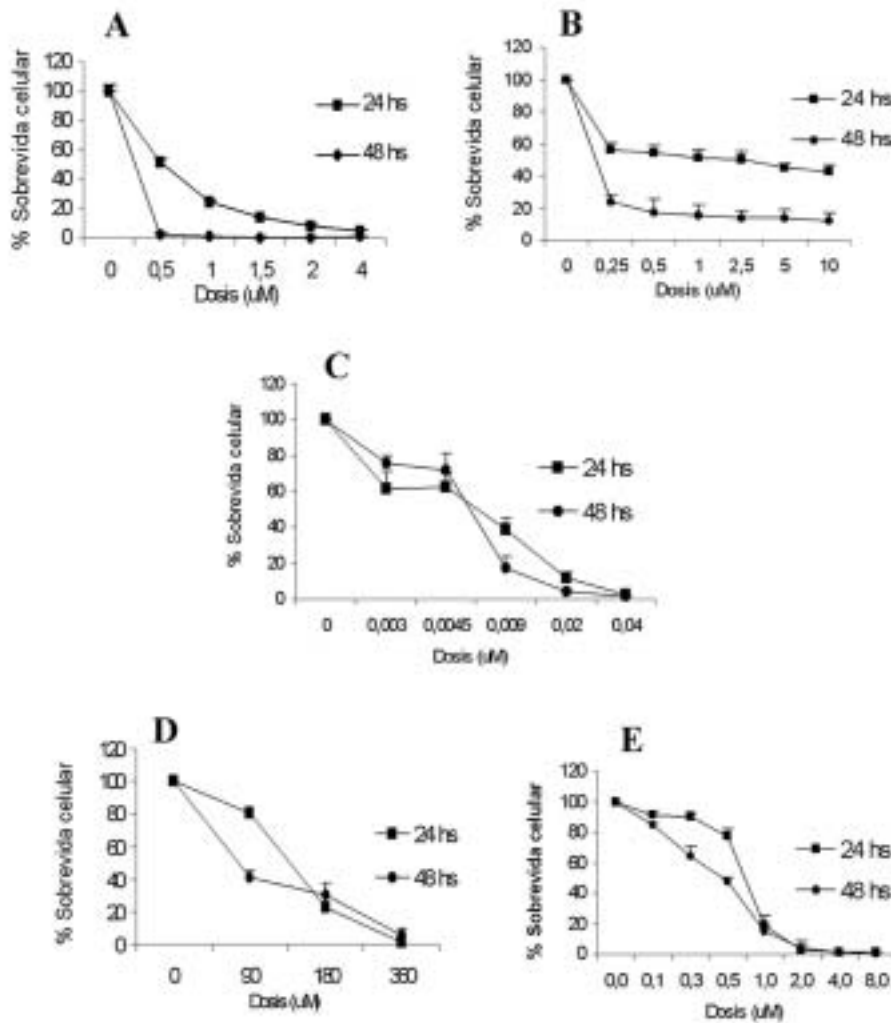


Figura 1. Efecto de los quimioterápicos e inhibidores de NFκB sobre el crecimiento celular. 5×10^5 células/mL fueron incubadas con distintas concentraciones de DOX (A), VCR (B), Gemcitabina (C), CAPE (D) o MG-132 (E) por 24 y 48 h. La proliferación celular se midió por incorporación de $[^3H]TdR$ y se estableció el porcentaje de supervivencia según consta en "Materiales y Métodos". Los experimentos se repitieron al menos tres veces, cada valor representa la media de un triplicado \pm DE de un experimento representativo.

llo de neoplasias pero la desregulación de la apoptosis juega un rol igualmente importante (21).

El balance entre eventos pro-apoptóticos y anti-apoptóticos regula el proceso de muerte celular programada que es crítico en la homeostasis de los tejidos, especialmente de los sistemas hematopoyéticos. Alteraciones en este delicado equilibrio ocurren en el cáncer, predominando el accionar de proteínas antiapoptóticas lo que otorga ventajas hacia la supervivencia promoviendo el desarrollo de neoplasias.

NFκB es una familia de proteínas citoplasmáticas que una vez activadas se unen al ADN actuando como inductor de genes que favorecen la proliferación y supervivencia leucocitaria. Cuando dicho factor se activa en forma constitutiva juega un rol esencial en el proceso

de transformación celular ya que está implicado en la activación de genes de citoquinas, proteínas antiapoptóticas y/o regulatorias del ciclo celular (22) (23) y protege a las células de la muerte inducida por ciertos quimioterápicos (ej. daunorubicina) (24). La inhibición de NFκB, por prevención de la degradación de IκB, es un mecanismo propuesto para la acción pro-apoptótica de glucocorticoides y algunos productos naturales, como el gliotoxina. Por lo expuesto, la capacidad de NFκB de inhibir la apoptosis, así como la de promover la proliferación celular, lo convierte en un blanco para el tratamiento de leucemias y linfomas (25) (26).

En los últimos años se ha focalizado la atención en la acción de drogas inhibitorias de la actividad de

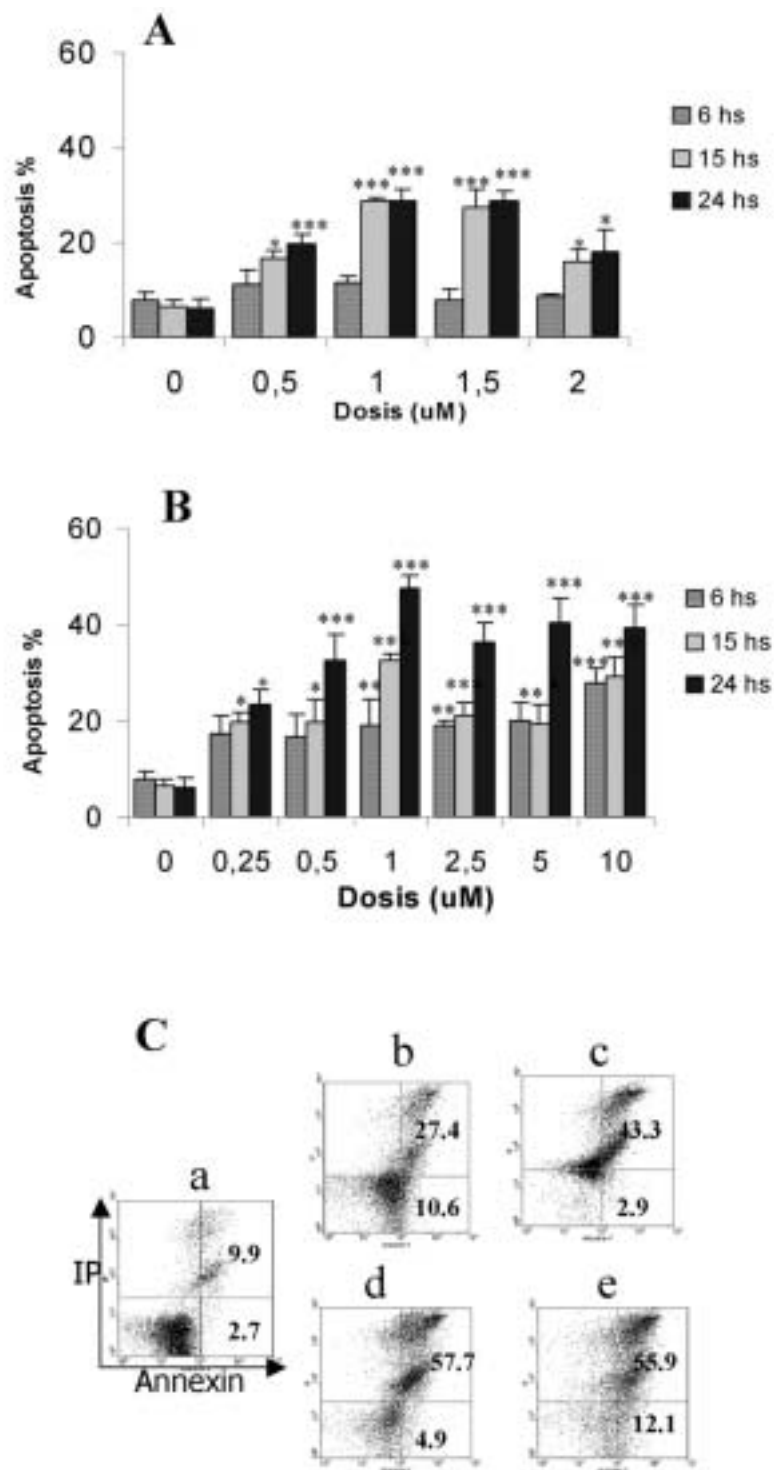


Figura 2. Efecto de DOX y VCR sobre la apoptosis celular (A-B). 1×10^6 céls/mL se cultivaron en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de los quimioterápicos (A: DOX, B: VCR) durante 6, 15 y 24 h y se evaluó la inducción de apoptosis mediante el análisis morfológico luego de la tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio como se indicó en "Materiales y Métodos". (C) Análisis de la apoptosis luego de 24 h de tratamiento por tinción Annexin-V (a: cél sin tratar, b: DOX 0.5 μ M, c: DOX 1.5 μ M, d: VCR 1 μ M, e: VCR 5 μ M). Los experimentos se repitieron al menos tres veces, cada valor representa la media de un triplicado \pm DE de un experimento representativo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

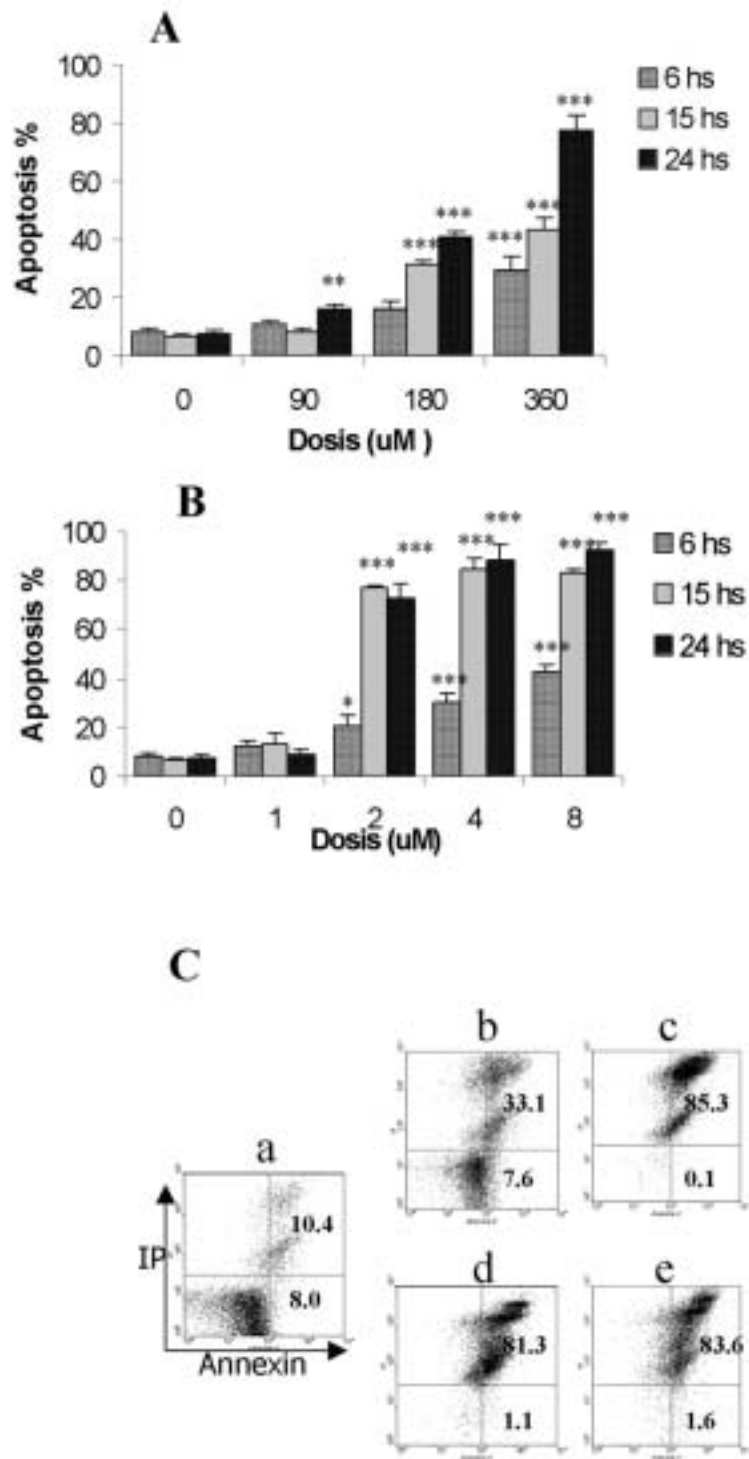


Figura 3. Inducción de apoptosis celular por CAPE y MG-132 (A-B). 1×10^6 céls/mL se cultivaron en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de los inhibidores (A: CAPE, B: MG-132) durante 6, 15 y 24 h y se analizó la morfología celular mediante la tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio. (C) Tinción con Annexin V y posterior análisis por citometría de flujo luego de 24 h de tratamiento (a: cél sin tratar, b: CAPE 180 μ M, c: CAPE 360 μ M, d: MG 2 μ M, e: MG 4 μ M). Los experimentos se repitieron al menos tres veces, cada valor representa la media de un triplicado \pm DE de un experimento representativo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

NFkB teniendo como base las numerosas evidencias sobre su rol en la sobrevivencia de células tumorales y más precisamente en linfomas y leucemias (27-32). Entre ellas ha resultado de interés la acción del ácido cafein fenil etil éster (CAPE) demostrando ser crítica sobre la proliferación, la síntesis de citoquinas y la inducción de apoptosis de células de origen linfocítico (27) (33), y el efecto de los inhibidores del proteosoma, ya que como fue demostrado por Nanjokat y col. éste ejerce un rol esencial en el mantenimiento de la sobrevivencia de las células leucémicas humanas confirmando los beneficios de sus inhibidores como potentes agentes anti-neoplásicos (34).

En el presente trabajo se investigaron los efectos de diversas drogas sobre la proliferación celular y la inducción de apoptosis en una línea celular recientemente obtenida en este laboratorio. Los resultados demuestran que la línea celular corresponde a células maduras de estirpe linfocítica B, sensibles a los efectos de los quimioterápicos testeados DOX, VCR y Gemcitabina de manera dosis y tiempo-dependiente. Se observó un efecto antiproliferativo debido probablemente a un bloqueo de la síntesis de ADN y alteración de la mitosis normal mediados por una inhibición de la actividad de la topoisomerasa II y de la polimerización de la tubulina del huso mitótico ya que éstos son los principales mecanismos de acción de estas drogas (35). Los efectos mencionados favorecen la inducción de apoptosis tanto para DOX como para VCR, tal como fue demostrado en pacientes con LLC-B y LLA (36).

Por su parte, los inhibidores CAPE y MG-132 también producen una disminución significativa del crecimiento celular lo que indicaría el importante papel que desempeña la vía de señalización de NFkB en la sobrevivencia de estas células. Nuevamente, el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular inducido por las drogas estudiadas está mediado por mecanismos de apoptosis celular. Estos resultados son concordantes con estudios realizados sobre diversas leucemias y linfomas tanto de origen T como B (27-32).

El estudio de los mecanismos de sobrevivencia celular provee nuevos conocimientos acerca de los procesos de desregulación de la apoptosis en cáncer y leucemias. Muchos blancos moleculares han sido propuestos como claves para el desarrollo de nuevas terapias contra patologías leucémicas (37). En la actualidad existen distintos tratamientos quimioterápicos, desde drogas hasta radiaciones ionizantes, que han logrado ser efectivos contra varias de las alteraciones hematológicas malignas. Sin embargo, son todavía muchos los tumores que se mantienen resistentes a los tratamientos utilizados. De esta manera queda en claro que una de las áreas más importantes de la investigación biomédica consiste en el desarrollo de nuevas terapias basadas en los conocimientos modernos de la tumorigénesis, los mecanismos de muerte celular y de resistencia a quimioterápi-

cos (38). Por tal motivo, se considera que este trabajo aporta evidencias que contribuyen a profundizar el conocimiento de aquellos aspectos relacionados con la sobrevivencia tumoral y la capacidad inductora de apoptosis de diversos quimioterápicos y drogas no convencionales con el fin último de ampliar y/o potenciar los blancos terapéuticos de las patologías leucémicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires y del CONICET.

Doxorubicina fue provista por Laboratorios Gador Argentina, Vincristina por Filaxis S.A. Argentina y Gemcitabina por Richmond Argentina.

CORRESPONDENCIA

BIOQ. VICTORIA CAVALIERE
Cátedra de Inmunología
Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)
Junín 956, 4to piso
1113 CIUDAD DE BUENOS AIRES - Argentina
E-mail: vcavaliere@ffyb.uba.ar

Referencias bibliográficas

1. Suarez VM. Inmunofenotipificación y supervivencia global. *Rev Cub Inmuno Hemat* 2002; 18 (1): 34-40.
2. XU Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carrol M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003; 102; 3: 972-80.
3. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-64.
4. Castilla LH, Garrett L, Adya N. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 1999; 23: 144-6.
5. Yuang Y, Zhou L, Miyamoto T. AML 1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukaemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10398-403.
6. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR. PML/RAR alpha and FTL3 induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 99: 8283-8.
7. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005; 106(2): 408-18.
8. Naoki M, Yasuaki Y, Tomoko H, Shuichi I, Yoshishiro Y, Masao Y *et al.* Expression of Survivin in HTLV-I infected T-cell lines and primary ATL cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 1110-3.
9. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G. Clinic relevance of P-glycoproteins expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 5: 1997-2004.
10. Kim JY, Lee S Hwangbo B. NFkB activation is related to the resistance of lung cancer cells to TNF-alpha-

- induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 140-6.
11. Guzman M, Neering SJ, Upchurch D. NFkB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukaemia cells. *Blood* 2001; 98: 2301-7.
 12. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. Nfkb antiapoptosis: induction of TRAF 1 and TRAF 2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-3.
 13. Guzman M, Swiderski CF, Howard DS. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1620-5.
 14. Lee RT, Collins T. Nuclear factor-kB and cell survival IAPs. *Circulation Res* 2001; 88: 262-4.
 15. Yang YL, Li TXM. The IAP family endogenous caspase inhibitors. *Cell Res* 2000; 40: 169-77.
 16. Del Poeta G, Stasi R, Venditi A. Prognostic value of cell marker analysis in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 388-94.
 17. Cerdá Zolezzi P, Fernández T, Aulicino P, Cavaliere V, Greczanik S, Caldas Lopez E *et al.* Ligaria cuneifolia fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multidrug resistant cells. *Immunobiology* 2005; 209 (10): 737-49.
 18. Lopes EC, Garcia MG, Vellon L, Álvarez É, Hajos S. Correlation between decreased apoptosis and multidrug resistance (MDR) in murine leukemic T cell lines. *Leuk Lymphoma* 2001; 42 (4): 775-87.
 19. Garcia MG, Alaniz L, Caldas Lopes E, Blanco G, Hajos S, Alvarez E. Inhibition of NFB activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines. *Leuk Res* 2005; 29: 1425-34.
 20. Dorai T, Aggarwal B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 2004; 215: 129-40.
 21. Evan GL, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-8.
 22. Karin M, Cao Y, Greten GF, Li ZW. NFkB in cancer from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301-10.
 23. Lin A, Karin M. NFkB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 107-14.
 24. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by transcription factor NFkB. *J Clin Invest* 2001; 107: 241-6.
 25. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas J, Liou HA, Schatner EJ. Modulation of NFkB activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2000; 164: 2200-6.
 26. Burgou R. Constitutive nuclear factor kappa B. Rel A Activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 2961-9.
 27. Sella S, Schattner E, Cesarman E. Inhibition of NFkB induces apoptosis of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 2000; 96 (7): 2537-42.
 28. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, *et al.* Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2002; 100 (5): 1828-34.
 29. Tomita M, Kawakami H, Uchihara JN, Okudaira T, Masuda M, Takasu N. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive active NF-kappaB, leading to suppression of cell growth of human T-cell leukaemia cells. *Int J Cancer* 2006; 118 (3): 765-72.
 30. Berenson JR, Ma HM, Vescio R. The role of nuclear factor NFkB in the biology and treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001; 28: 626-33.
 31. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NFkB activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol* 2003; 171: 88-95.
 32. Pérez-Galán P, Roué G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 2006; 107: 257-64.
 33. Aleskog A, Larsson R, Hoglund M, Kristensen J, Nygren P, Lindhagen E. *In vitro* drug resistance in B cell chronic lymphocytic leukemia: a comparison with acute myelocytic and acute lymphocytic leukemia. *Anticancer drugs* 2005; 3: 277-83.
 34. Naujokat C, Sezer O, Zinke H, Leclere A, Hauptmann S, Possinger K. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *Eur J Haematol* 2000; 65 (4): 221-36.
 35. Perry M. *The Chemotherapy Source Book*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 489- 90.
 36. Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA sintesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z Naturforsch (C)* 2003; 58 (7-8): 580-9.
 37. Redd JC, Pellicchia M. Apoptosis- based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005; 106: 408-18.
 38. Zhivotovsky B, Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 125-34.

Aceptado para su publicación el 10 de marzo de 2006

