

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL COMPUESTO LURBINECTEDIN SOBRE
CÉLULAS LEUCOCITARIAS NORMALES Y MALIGNAS DE
LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA”.**

**TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA.**

Autora:

Lic. María Mercedes De Los Ríos Alicandú

Directora:

Dra. Mirta Giordano

Laboratorio de la Unidad de Inmunología Oncológica, Instituto de Medicina
Experimental IMEX/CONICET-Academia Nacional de Medicina.

Buenos Aires, 2014.

A mí madre, por su apoyo incondicional en esta aventura.

RESUMEN

Antecedentes: Lurbinectedin, un alcaloide capaz de unirse al surco menor del ADN, presenta actividad antitumoral contra diferentes tumores sólidos, pero no ha sido evaluado aún en neoplasias hematológicas. La leucemia linfática crónica (LLC) es la leucemia más frecuente del adulto y pese a los avances terapéuticos logrados en los últimos años sigue siendo una enfermedad incurable. La supervivencia y multiplicación de las células B malignas en LLC dependen de señales del microambiente tumoral que están dadas por leucocitos no malignos, células estromales y endoteliales.

Objetivos: Investigar la actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre poblaciones leucocitarias humanas, evaluando la sensibilidad de los linfocitos B, T, células NK y monocitos de donantes sanos y pacientes con LLC. Investigar además el mecanismo de muerte celular inducido por Lurbinectedin.

Materiales y Métodos: Separación de leucocitos de sangre periférica humana e incubación con Lurbinectedin. Evaluación de la muerte celular con la sonda fluorescente 7-AAD y análisis por citometría de flujo. Identificación de las poblaciones leucocitarias con anticuerpos específicos. Detección de la ruptura del ADN por evaluación de la expresión de γ H2AX por citometría de flujo. Detección de la fragmentación de PARP por Western blot.

Resultados: Lurbinectedin induce muerte celular de manera dosis-dependiente sobre todas las poblaciones leucocitarias evaluadas, siendo los linfocitos B normales y leucémicos y las células de estirpe mieloide más sensibles que los linfocitos T y las células NK. En muestras de pacientes LLC, Lurbinectedin afecta la viabilidad de las células B leucémicas a través de la eliminación de las células de tipo nodriza diferenciadas de monocitos. El mecanismo citotóxico en células LLC involucra la fosforilación de la histona H2AX y la fragmentación de PARP.

Conclusiones: Lurbinectedin es un agente citotóxico eficaz contra células B leucémicas de pacientes LLC ejerciendo no sólo un efecto directo si no también indirecto a través de la eliminación de las células de estirpe nodriza que colaboran con la supervivencia de las células leucémicas. La menor sensibilidad de los linfocitos T y células NK supondría una ventaja para el tratamiento de estos pacientes que presentan una inmunosupresión característica.

ABSTRACT

Background: Lurbinectedin, an alkylating minor groove DNA-binder, has cytotoxic activity against different solid tumors, but it has not been evaluated in hematological malignancies yet. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent leukemia in the adult and, despite the therapeutic advances made in recent years, it remains an incurable disease. The survival and proliferation of malignant B cells in CLL depend on tumor microenvironment signals which are given by non-malignant leukocytes, stromal and endothelial cells.

Objectives: To investigate the cytotoxic activity of Lurbinectedin on human leukocyte populations, comparing the sensitivity of B, T, NK cells and monocytes from healthy donors and patients with CLL. To analyze the mechanism of cell death induced by Lurbinectedin.

Materials and Methods: Isolation of human peripheral blood leukocytes and in vitro incubation with Lurbinectedin. Assessment of cell death with the fluorescent probe 7-AAD and flow cytometry analysis. Identification of leukocyte populations by specific antibodies. Detection of DNA breaks by evaluating γ H2AX expression by flow cytometry. Detection of PARP cleavage by Western blot.

Results: Lurbinectedin induces cell death in a dose-dependent manner over all leukocyte populations evaluated, being normal and leukemic B cells and myeloid cells more sensitive than T lymphocytes and NK cells. In samples from patients with CLL, Lurbinectedin reduces viability of leukemic B cells through the elimination of nurse like cells differentiated from monocytes. The cytotoxic mechanism in CLL cells involves phosphorylation of histone H2AX and PARP fragmentation.

Conclusion: Lurbinectedin is an effective cytotoxic agent against leukemic B cells from CLL patients, inducing not only a direct but also an indirect effect by removing nurse like cells that promote leukemic cells survival. Decreased sensitivity of T and NK cells to Lurbinectedin would be an advantage for the treatment these patients who present a typical immunosuppression.

AGRADECIMIENTOS

Ofrezco mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna forma u otra, formaron parte del camino que recorrí para finalizar este trabajo.

A las mentes orientadoras del Laboratorio de Inmunooncología de la Academia de Medicina: Mirta, Mercedes, Romina, Mónica, Gabriela, Analía, Laura, Carolina y Pablo, gracias por su paciencia, constancia, dedicación y amabilidad ante cualquier situación que surgiera en mi día a día en el laboratorio.

A los compañeros de mesada y cursada: Sole, Flor, Angie, Pau, Betty, Ana, y Leo, les agradezco haberme ofrecido apoyo y amistad en momentos buenos y malos.

A mi familia, que desde la distancia me brindaron toda la energía que necesité para emprender los retos que se me presentaban y por ser el pilar del cual nace mi valor.

A mis nuevos y viejos amigos, que estando en cualquier parte del mundo, siempre me colmaron de cariño y consuelo.

A las pequeñas lucitas en mi vida, Grazia y Cybele, les doy también las gracias por representar la fuerza de mi motivación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Antecedentes:	1
Introducción	1
Nuevas drogas antineoplásicas de origen marino. Ecteinascidinas.	1
Lurbinectedin.	2
Muerte celular programada.	4
Fosforilación de la histona H2AX.	5
Leucemia Linfática Crónica. Definición.	6
Patogénesis.	7
Microambiente e interacciones celulares.	7
Papel de otras poblaciones leucocitarias.	9
Complicaciones de la LLC.	9
Tratamiento de la LLC.	9
Justificación.	10
Objetivos: Objetivo General. Objetivos Particulares.	12
Materiales y Métodos:	13
Obtención de las muestras de sangre periférica.	13
Purificación de las células mononucleares totales.	13
Diferenciación de monocitos a Células tipo Nodriz.	14
Cuantificación de la muerte celular.	14
Identificación de la susceptibilidad de las subpoblaciones celulares a la Lur.	14
Determinación de la expresión de γ H2AX por Citometría de Flujo.	15
Evaluación de la fragmentación de PARP por Western blot.	15
Análisis estadístico.	16
Resultados:	17
Efecto de Lurbinectedin sobre células mononucleares de sangre periférica de dadores normales.	17
Efecto diferencial de Lurbinectedin sobre las poblaciones linfocitarias de sp de dadores sanos.	18
Efecto de Lurbinectedin sobre células mononucleares de sp de pacientes con LLC.	21
Efecto diferencial de Lurbinectedin sobre las poblaciones linfocitarias de pacientes con LLC.	22
Efectos de Lurbinectedin sobre las células tipo nodriza.	24
Evaluación de la expresión de γ H2AX en células mononucleares periféricas de pacientes con LLC.	25
Inducción de la fragmentación de PARP por Lurbinectedin en células de pacientes con LLC.	27
Discusión.	29
Referencias.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de la Ecteinascidina.	2
Figura 2. Estructuras químicas de Lurbinectedin y Trabectedin.	3
Figura 3. Modelo de unión covalente Lurbinectedin-ADN.	4
Figura 4. Modelo esquemático de los efectos intranucleares de Lur.	6
Figura 5. Esquema de las interacciones celulares dentro de centros proliferantes.	8
Figura 6. Imagen de corte histológico de nódulo linfático de paciente con LLC.	8
Figura 7. Micrografía de una Célula tipo Nodriz.	14
Figura 8. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre CMT de dadores sanos.	17
Figura 9. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre linfocitos de donantes sanos.	19
Figura 10. Proporciones celulares luego de exponer CMT de donantes sanos a Lur durante 24 hrs.	20
Figura 11. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre monocitos de donantes sanos.	20
Figura 12. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre CMT de pacientes LLC.	22
Figura 13. Proporción de linfocitos B, T y NK luego de exponer CMT de pacientes LLC a Lur 10nM durante 24 hrs.	23
Figura 14. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre monocitos de pacientes LLC.	24
Figura 15. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre NLC.	25
Figura 16. Efecto de la Lurbinectedin sobre la expresión de γ H2AX en células LLC.	26
Figura 17. Efecto de Lurbinectedin sobre la expresión de PARP α en CMT de pacientes LLC.	28
Figura 18. Efecto de Lurbinectedin sobre la expresión de PARP α en CMT de pacientes LLC (Relación).	28

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Porcentajes de células LLC que expresan γ H2AX luego de 24 hrs con vehículo o Lur 10 nM.	27

ANTECEDENTES

Las drogas antitumorales usadas en la terapia contra el cáncer están dirigidas a inducir la muerte de células malignas, limitando el crecimiento y dispersión de las mismas. El ADN constituye uno de los blancos terapéuticos más importantes en la lucha contra el cáncer. La estabilidad de la molécula de ADN puede verse afectada por alteraciones del pH, temperatura, determinados solventes y la unión de proteínas particulares (1 ; 2). Procesos cruciales del ciclo celular, como la replicación, transcripción, recombinación y reparación, pueden ser interrumpidos por la acción de drogas antitumorales que, al unirse al ADN, alteran el correcto ensamblado de ambas hebras de dicha molécula (3). No obstante, el efecto citotóxico de las drogas dirigidas contra el ADN presenta poca especificidad frente a las células normales, lo que implica la necesidad de investigar continuamente en busca de nuevas estrategias terapéuticas diseñadas contra las células neoplásicas en forma selectiva.

El ecosistema marino ha demostrado tener gran potencial para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes que actúan contra numerosos blancos celulares de relevancia en oncología. En particular, los animales sésiles del mundo marino, debido a su vulnerabilidad, producen sustancias químicas altamente tóxicas que utilizan como autodefensa contra sus depredadores. Dentro del grupo de drogas en desarrollo clínico, figuran las Ecteinascidinas, derivadas de tunicados coloniales como *Ecteinascidia turbinata*. Estos agentes que en un principio se preparaban por aislamiento a partir de extractos de los tunicados actualmente son sintetizados *in vitro*. (4).

NUEVAS DROGAS ANTINEOPLÁSICAS DE ORIGEN MARINO

ECTEINASCIDINAS

Las ecteinascidinas son alcaloides que consisten en dos o tres subunidades tetrahidroisoquinolina unidas y un grupo funcional carbonilo activo. Se han convertido en buenos candidatos para el desarrollo de drogas antitumorales por su potente actividad antiproliferativa demostrada contra una gran variedad de células tumorales (5 ; 6).

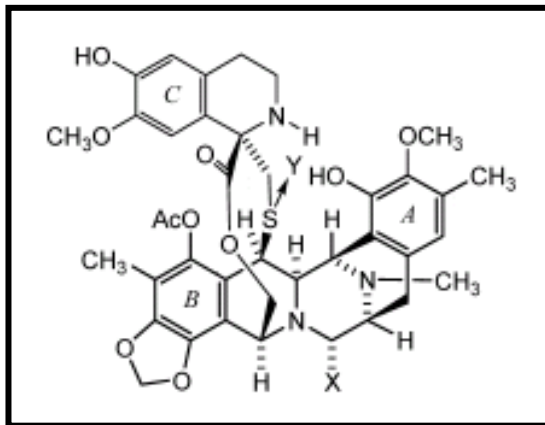


Figura 1. Estructura de la Ecteinascidina, producto natural, mostrando los anillos A, B y C.
Fuente: Puthongking P *et al.* 2006

Uno de los primeros compuestos producidos a partir de la investigación de estas sustancias es Trabectedin (Yondelis®, ET-743), molécula capaz de unirse en forma selectiva a guaninas presentes en la doble hélice del ADN. A diferencia de otras drogas con uniones parecidas al ADN, Trabectedin presenta una baja mielotoxicidad que permite su empleo sin causar graves trastornos hematopoyéticos. Actualmente se encuentra aprobada para su uso en cáncer de ovario refractario. Asimismo, ha probado ser efectiva en sarcomas de tejidos blandos en pacientes pretratados, avanzados y metastásicos (3 ; 8).

LURBINECTEDIN

Lurbinectedin (PM01183) es un novedoso alcaloide sintético estructuralmente similar a Trabectedin, a excepción de la subunidad C, en la cual la tetrahydroisoquinolina es reemplazada por una tetrahydro β -carbolina. Este cambio estructural confiere beneficios en su actividad intrínseca al permitir el establecimiento de interacciones directas con factores de las vías de reparación del ADN.

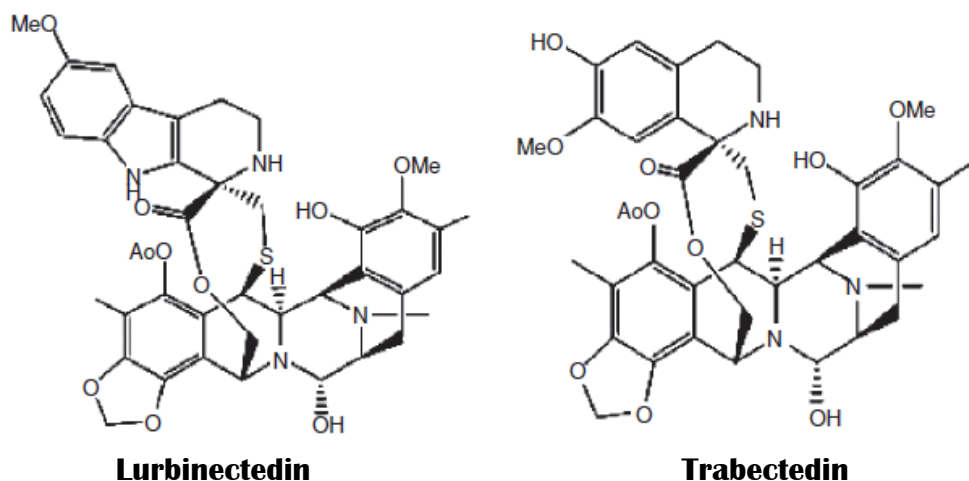


Figura 2. Estructuras químicas de Lurbinectedin y Trabectedin, donde se aprecia la modificación del anillo C.

Fuente: Soares *et al.* 2011.

El mecanismo de acción de esta droga viene dado por la unión covalente a guaninas ubicadas en segunda posición de determinados tripletes, cuando éstos se hallan en el surco menor del ADN, lo que induce quiebres de la doble cadena. Este tipo de lesiones es extremadamente perjudicial para la supervivencia celular y el mantenimiento de la estabilidad genómica, cuando no pueden ser reparadas eficientemente por la maquinaria de reparación del material genético. Se dispara entonces el arresto del ciclo celular en fase S y subsecuentemente ocurre la apoptosis (9 ; 10). En ensayos *in vitro*, la Lurbinectedin demostró una potente actividad citotóxica sobre 23 líneas celulares tumorales, lo cual pudo trasladarse a pruebas *in vivo* sobre 4 modelos de xenotransplante de tumores humanos sin evidenciarse efectos tóxicos en los animales (10). Se encuentra actualmente en fase I de ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos (11).

Lurbinectedin se desarrolló con intención de mejorar la capacidad terapéutica de Trabectedin. En una reciente publicación se estudió comparativamente los efectos *in vitro* e *in vivo* de ambas drogas con especial énfasis sobre los mecanismos de reparación del ADN (12). Se encontró que las células deficientes en la maquinaria de reparación por excisión de nucleótido (NER) son más resistentes a Lurbinectedin y Trabectedin, mientras que las células deficientes en la maquinaria de recombinación homóloga (HR) son más sensibles. La resistencia celular a estas drogas en ausencia de la maquinaria NER es peculiar ya que ocurre lo contrario para la mayoría de las drogas

antineoplásicas que inducen daño al ADN. Se ha sugerido que Trabectedin formaría complejos moleculares con proteínas NER y ADN de alta toxicidad para la célula, pero éste es un tema aún no resuelto. De este trabajo se concluye que no hay diferencias significativas entre ambas drogas en relación a su acción sobre la maquinaria de reparación del ADN. Hasta el momento las mayores diferencias entre ambos compuestos son sus características farmacocinéticas.

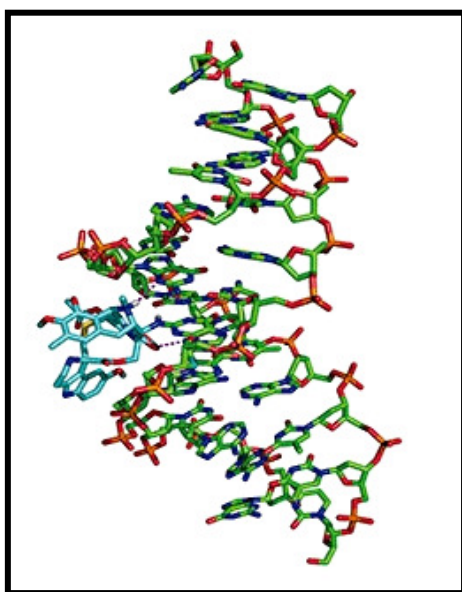


Figura 3. Modelo de la unión covalente entre Lurbinectedin (en azul claro) y un oligonucleótido que contiene un triplete CGG (en verde, rojo y azul). Los anillos A y B interactúan con el ADN, mientras que el anillo C protruye fuera de la doble hélice, interactuando y/o interfiriendo con proteínas nucleares.

Fuente: Leal *et al.* 2010.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Los agentes anti-neoplásicos pueden inducir la muerte de las células tumorales a través de distintos mecanismos. En el caso de las Ecteinasquinas el proceso que se desencadena es la inducción de la apoptosis. En este tipo de muerte celular programada las células sufren cambios morfológicos característicos como la condensación de la cromatina formándose cuerpos apoptóticos rodeados de la membrana plasmática, lo que evita que el contenido del citoplasma escape al medio extracelular provocando inflamación (13). Paralelamente la membrana sufre cambios en el reordenamiento de algunos componentes exponiéndose en la cara externa fosfatidilserina, que permite, junto con otras moléculas, el reconocimiento de la célula apoptótica por parte de los fagocitos (14). El proceso de apoptosis en la mayoría de las células depende de la activación de una familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas, las cuales pueden ser clivadas proteolíticamente a formas activas luego del

estímulo apoptótico, en lo que se conoce como cascada de activación de las caspasas (15). Dentro del conjunto de estímulos que pueden dar lugar a la activación de las caspasas se encuentran, entre otros, la activación de receptores de muerte, la hipoxia y el daño directo al ADN. Cualquiera sea el estímulo que la haya desencadenado, la activación de las caspasas culmina con la estimulación de endonucleasas que clivan el ADN en fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases. Asimismo, se produce el clivaje de los sustratos de las caspasas, como las polimerasas poliADPribosa (PARP), familia de enzimas nucleares que tienen un rol crucial en la reparación del ADN al actuar como sensores del daño a simple cadena y que presentan un dominio susceptible al clivado por caspasas (16 ; 17).

FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H2AX

Los agentes que inducen la ruptura de la doble hélice de ADN como es el caso de las Ecteinascidinas estimulan la fosforilación de la histona H2AX. Esta proteína es una variante de la familia de histonas H2A que conforman los nucleosomas junto con el ADN y proteínas de bajo peso molecular. H2AX está compuesta de un dominio globular central flanqueado por colas N-terminal y C-terminal que poseen sitios para modificaciones postraduccionales (18). En el extremo C-terminal presenta un residuo serina (Ser-139) que sufre una rápida fosforilación cuando existe una ruptura de la doble cadena del ADN (19), generándose la forma γ H2AX. Una vez producida, γ H2AX se acumula en los sitios del daño y, si la ruptura de la doble hélice de ADN no es rápidamente reparada, se induce la activación de las caspasas que llevará finalmente a la apoptosis (20). Esta magnificación del evento de quiebre por acumulación de γ H2AX hace posible detectar la lesión mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti- γ H2AX. En los últimos años, la detección de γ H2AX por técnicas inmunohistoquímicas o de citometría de flujo ha sido de gran utilidad para poner en evidencia la ruptura de la doble hélice de ADN.

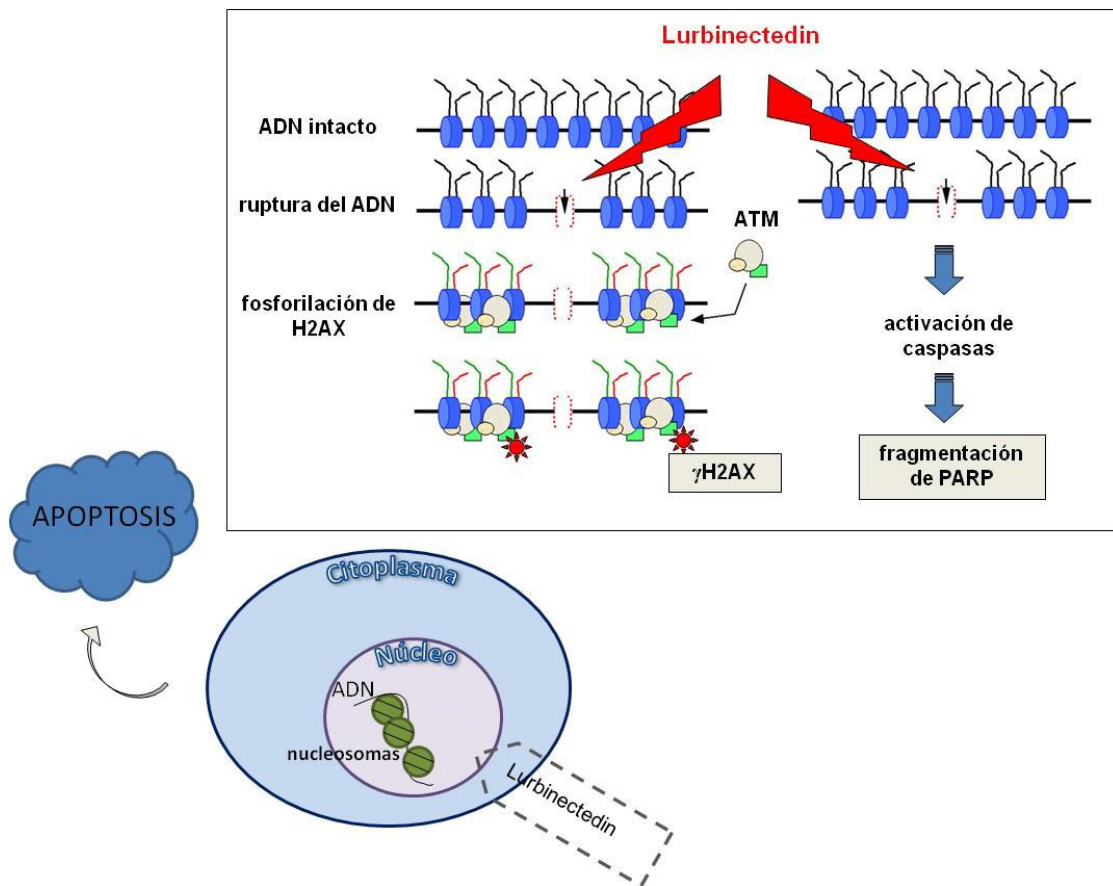


Figura 4. Modelo de los efectos intranucleares de Lurbinectedin. Se muestra esquemáticamente el efecto de la droga sobre la cromatina, desencadenando el quiebre de la doble hélice de ADN, con la subsecuente activación de la apoptosis y acompañado de la acumulación de γ H2AX y el clivado de PARP. No se han descrito los mecanismos de ingreso de la molécula al interior celular.

LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

DEFINICIÓN

La Leucemia Linfática Crónica (LLC) es una enfermedad que implica la acumulación de linfocitos B neoplásicos monoclonales en sangre, órganos linfoides periféricos y en médula ósea. Existen dos mecanismos involucrados en esta entidad: señales extrínsecas a las células B que permiten la evasión de la apoptosis y una continua proliferación de una baja proporción las células neoplásicas en los tejidos linfáticos, lo que lleva a su acumulación sistémica (21 ; 22).

La LLC es la leucemia más común en los países de Occidente (23). Se estima que más de 16.000 hombres y mujeres fueron diagnosticados y aproximadamente el 7% de ellos fallecieron a consecuencia de la enfermedad en 2012 (24). La edad promedio del diagnóstico es de 72 años, observándose casos que se reportan entre los

34 años hasta pasados los 85 (23 ; 25). Esta leucemia se presenta de manera muy variable; algunos pacientes no manifiestan ningún o muy pocos síntomas durante el curso de su enfermedad, pudiendo incluso vivir durante muchos años, sin necesidad de recibir tratamiento. Por otro lado, existen casos de pacientes que experimentan un rápido deterioro que, incluso bajo una terapia agresiva, mueren a los pocos meses del diagnóstico (25). Actualmente, permanece incurable.

PATOGÉNESIS

Esta enfermedad es vista como una proliferación de linfocitos B, seleccionados por expansión clonal a través de encuentros múltiples con determinados autoantígenos, que se acumulan en los órganos linfoides periféricos y en médula ósea y luego fluyen hacia sangre periférica (26). Es en los tejidos donde las células LLC reciben señales de supervivencia y proliferación a través de la interacción con diversos tipos celulares que favorecen su acumulación. Además, las células LLC son capaces de condicionar su microambiente al reclutar linfocitos T activados y células mieloides, gracias a la secreción de determinadas quimiocinas, como CCL3, CCL4, CCL22 e IL-8 (21). A su vez, las propias células LLC ingresan desde la sangre a los tejidos linfáticos gracias al reconocimiento de quimiocinas como CXCL12, CXCL13 y CCL21 que son secretadas por células dendríticas y estromales. Por lo tanto, el tráfico linfocitario juega un rol crítico en la patofisiología de la LLC. (27).

MICROAMBIENTE E INTERACCIONES CELULARES

Existe una organización microambiental única, alrededor de células malignas propias de un tipo de cáncer, que implica: la exposición constante de las células a factores de crecimiento e inflamación, la formación de nuevos vasos sanguíneos que proveen de nutrientes y tolerancia inmunológica que evade la eliminación mediada por el sistema inmune, todo lo cual resulta en proliferación del clon maligno (21). El análisis de los tejidos linfoides en LLC ha evidenciado agregados extensos y focalizados de células leucémicas que forman áreas nodulares dentro de los ganglios y en médula ósea, con numerosos infiltrados de linfocitos T en contacto cercano con las células LLC, formándose entonces estructuras definidas llamadas **Centros Proliferantes**. En ellos, las células leucémicas que probablemente reciban señales de activación a través de su

receptor antigénico (BCR), son acompañadas por linfocitos T CD4⁺ activados, células de estirpe mieloide y estromales. En este entorno las células LLC pueden acumularse y proliferar (21 ; 27).

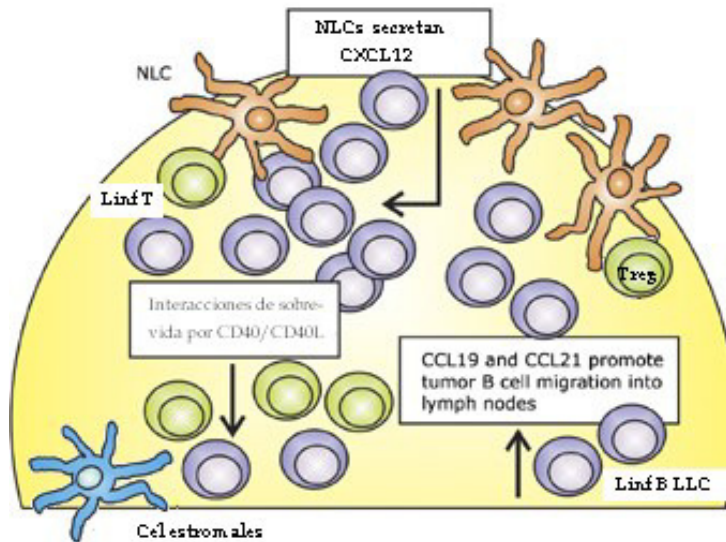


Figura 5. Esquema de las interacciones celulares dentro de los centros proliferantes.
Fuente: Modificado de Herreros *et al.* 2008.

Las células estromales -aquí referidas- son aquéllas que componen el tejido de soporte dentro de la médula ósea y tejidos linfoides; son de origen mesenquimal y proveen ¹sitios de anclaje y factores de crecimiento durante la maduración de las células hematopoyéticas y ²un nicho de soporte para las células leucémicas (28).

Por otra parte, existen unas células mononucleares derivadas de monocitos en experimentos *in vitro*, las cuales se caracterizan por ser largas, redondeadas y adherentes, llamadas **Células Tipo Nodriz** (*nurse-like cells*, NLC). En pacientes LLC se encuentran acumuladas abundantemente dentro de los centros proliferantes, unidas en estrecho contacto a las células LLC brindándoles protección contra la apoptosis (28 ; 29).

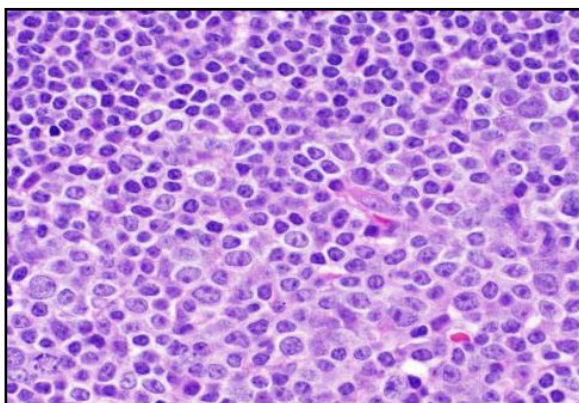


Figura 6. Imagen de centro proliferante en corte histológico de nódulo linfático de paciente con LLC. Se observa la distribución de células linfoides con citoplasma evidente y núcleos con cromatina difusa que se encuentran rodeadas por linfocitos pequeños con características típicas de células LLC.

Fuente:
<http://pathologypics.com/PictView.aspx?ID=304>

PAPEL DE OTRAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS

El número total de linfocitos T circulantes en sangre periférica de pacientes LLC se encuentra incrementado, pero son incapaces de establecer sinapsis inmunológicas efectivas (30). Las células LLC secretan citoquinas inmunomodulatorias que inducen el cambio de perfil de los linfocitos T helper, de Th1 a Th2, evento que implica anergia frente a la enfermedad (26).

Por otra parte, a pesar de que los niveles circulantes de linfocitos NK están elevados, se han reportado alteraciones funcionales que conllevan a una defectuosa actividad citotóxica por parte de estas células en pacientes LLC, lo que acarrea la acumulación de los linfocitos B leucémicos (31 ; 32).

COMPLICACIONES DE LA LLC

Los pacientes con LLC presentan severas anomalías en el sistema del complemento que se asocian con predisposición a infecciones y autoinmunidad (27). Además, debido a la hipogammaglobulinemia subyacente y la citopenia producida por la infiltración masiva de células leucémicas en médula ósea, particulares de esta condición hematológica, son comunes las infecciones bacterianas y virales; a todo lo cual se suman defectos en la actividad de las demás células inmunes (21). Con el tratamiento activo se origina mayor déficit en la inmunidad mediada por células, lo que ocasiona aumento en la incidencia de infecciones oportunistas bacterianas y fúngicas (33).

TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

Debido a su lenta progresión, la LLC fue considerada durante mucho tiempo como una enfermedad "indolente" y que no requería tratamiento. Sin embargo, en la gran mayoría de los pacientes la enfermedad progresa, se incrementa el número de células leucémicas en circulación, se presentan adenopatías, esplenomegalia y la infiltración medular provoca, usualmente complicaciones que hacen necesario el tratamiento. Hasta hace unos años, la terapia para LLC consistía en regímenes basados en agentes alquilantes como Clorambucilo o Ciclofosfamida, solos o combinados con corticoides (34). La introducción de análogos de nucleósidos como Fludarabina,

Pentostatina y Cladibrina significó un cambio sustancial en la terapia de la LLC (35). Posteriores investigaciones en la década pasada se focalizaron en el desarrollo de la combinación de regímenes con el objetivo de lograr la remisión completa y mejorarla sobrevida global de los pacientes. Actualmente el tratamiento estándar para los pacientes LLC consiste en la combinación de Fludarabina, Ciclofosfamida y el anticuerpo monoclonal anti-CD20, Rituximab (36). Si bien la mayoría de los pacientes responden positivamente a este tratamiento, eventualmente todos los pacientes recaen, con la aparición de clones resistentes que hacen necesario emplear tratamientos más agresivos.

Es importante señalar que las terapias comúnmente son efectivas en eliminar a las células LLC circulantes en sangre periférica. Sin embargo, el acceso de las drogas a los tejidos linfáticos es más difícil y se considera que permanecen viables algunas células residuales en los nichos de proliferación de médula ósea y ganglios. Las células malignas secuestradas en estos tejidos reciben protección de parte de su microambiente estromal mediante continuas señales de sobrevida y proliferación (29) y son las responsables de la reaparición de la enfermedad con el tiempo.

La búsqueda de nuevos antineoplásicos para LLC que afecten no sólo a las células leucémicas si no también a las células que las protegen en los centros proliferantes, como ser las estromales y las células tipo nodriza, es un área de gran interés y desarrollo.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se considera de relevancia las células no-malignas del microambiente linfático como aquéllas capaces de colaborar en la sobrevida y proliferación de las células LLC. Muchas de estas poblaciones no-malignas son además células del sistema inmune, cuyo papel central es el de ejercer una actividad de vigilancia anti-tumoral, pero que pueden ser controladas por el tumor para evadir su ataque. Por otra parte, es importante señalar que el sistema inmune puede ver alterada su función anti-infecciosa no sólo por el tumor si no también por el tratamiento anti-tumoral. En base a estas consideraciones, se decidió evaluar los

efectos citotóxicos de Lurbinectedin no sólo en las células leucémicas de pacientes LLC, sino también en leucocitos no malignos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Investigar la actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre leucocitos humanos normales y malignos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la sensibilidad de las poblaciones de linfocitos B y T, células NK y monocitos normales a Lurbinectedin.
- Evaluar la sensibilidad de las células de leucemia linfática crónica, linfocitos T, células NK y monocitos de pacientes LLC a Lurbinectedin.
- Estudiar el mecanismo citotóxico de Lurbinectedin en leucocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Los estudios fueron realizados con muestras de sangre periférica obtenida de donantes sanos voluntarios y pacientes con LLC diagnosticados de acuerdo a estándares clínicos y criterios de laboratorio. Los pacientes LLC concurren al Servicio de Oncohematología del Instituto de Investigaciones Hematológicas y a los Servicios de Hematología de los Hospitales T. Álvarez y Policlínico Bancario de la Ciudad de Buenos Aires. Los estudios realizados para esta tesis de maestría forman parte de un proyecto de investigación que cuenta con el aval del Comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina. Los pacientes LLC fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito.

PURIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES TOTALES

La sangre entera se diluyó a la mitad en solución fisiológica y fue sembrada sobre una solución de Ficoll-Triyosom, siendo centrifugado a 1500 rpm durante 30 minutos a 5°C. Luego se recogió la interfase donde se encuentran las células mononucleares totales (CMT) que comprenden al conjunto de poblaciones linfoides y a los monocitos. Esta interfase se lavó dos veces con solución fisiológica centrifugando por 10 minutos, una vez a 1500 rpm y otra a 800 rpm. Las CMT fueron finalmente resuspendidas en medio RPMI 640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 U/ml de penicilina más 100 µg/ml de estreptomina.

Las muestras de CMT fueron utilizadas en el mismo día o resuspendidas en suero fetal bovino adicionado con 10% de dimetilsulfóxido y criopreservadas en tanque de nitrógeno líquido. La viabilidad de las muestras utilizadas luego de la criopreservación se evaluó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el colorante ioduro de propidio-naranja de acridina, las muestras con porcentajes de necrosis o apoptosis mayores a 10 fueron descartadas

DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A CÉLULAS TIPO NODRIZA

Las células tipo nodriza (*nurse-like cells*, NLC) se diferenciaron a partir de monocitos provenientes de pacientes LLC que se cultivaron en presencia de células leucémicas durante dos semanas con medio completo, en placas de 12 pozos de fondo plano. Al cabo de este tiempo se observan células adherentes, de gran tamaño y forma redonda que corresponden a las NLC descritas previamente (Figura 7).

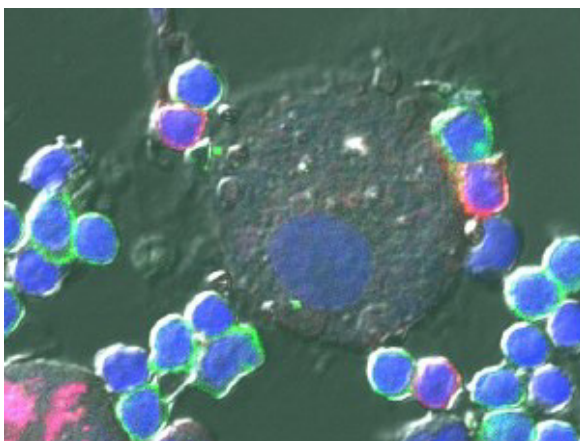


Figura 7. Micrografía de una Célula tipo Nodriza junto a Linfocitos T CD4+ (en rojo) y Células Leucémicas (en verde). Los núcleos están teñidos con el colorante TOPRO-3.

Fuente: Microscopio confocal FluoView FV1000.

CUANTIFICACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

La muerte celular de las células mononucleares expuestas a Lurbinectedin se evaluó utilizando el colorante 7-AAD y análisis por Citometría de flujo. Este reactivo fluorescente ingresa únicamente a las células que han perdido la integridad de las membranas plasmática y nuclear, intercalándose en el ADN. Para su marcación, se incubó la suspensión celular de interés a una concentración final del colorante de 0,5µg/ml durante 20 min, en tubos de polipropileno, protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Inmediatamente después, fueron analizados por Citometría de flujo utilizando un equipo FACSCalibur™ y el programa CellQuest.

IDENTIFICACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES A LA LURBINECTEDIN

Se identificaron las subpoblaciones linfocitarias y monocitos con anticuerpos específicos para determinar susceptibilidad diferencial al compuesto. A tal fin se emplearon los anticuerpos de BD Biosciences dirigidos contra linfocitos T (CD3), células NK (CD56), linfocitos B (CD19) y monocitos (CD14). El análisis se realizó por Citometría de flujo evaluando la proporción de cada subpoblación en la región de células viables.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE γ H2AX POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La evaluación de γ H2AX como consecuencia de la ruptura del ADN se realizó sobre CMT de pacientes LLC que fueron previamente tratadas o no con Lurbinectedin. Las CMT (> 90% células leucémicas) se fijaron en metanol frío por incubación durante al menos 15 minutos. Las células fueron lavadas una vez con tampón fosfato suplementado con 2% de albúmina sérica bovina (PBS-BSA) y una segunda vez con PBS-BSA 0,5%. Para permeabilizar las células se utilizó PBS-Tween 0,2% con el que se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las células fueron resuspendidas en solución de glicina 0,1% para minimizar el pegado inespecífico del anticuerpo. Después de incubarlas por 5 min se agregó el anticuerpo anti- γ H2AX o un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo en los controles, se las incubó 30 min a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente antes de agregar el anticuerpo secundario, el cual se incubó 20 min a 4°C. Se suspende en PBS-BSA 0,5% para proceder al análisis por citometría de flujo.

EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE PARP POR WESTERN BLOT

Las CMT ($2,5 \times 10^6$) provenientes de pacientes LLC se cultivaron en presencia de Lurbinectedin (10 nM) o solución fisiológica como control durante 36 hs en estufa a 37°C. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con PBS frío y el *pellet* celular fue resuspendido en tampón de carga (60mM Tris pH6.8, 2.3% SDS, 10% Glicerol, 0.01% azul de bromofenol y 5% β -Mercaptoetanol) siendo inmediatamente calentado por 5 min a 96°C. El calentamiento de las muestras y la utilización de un agente reductor como el β -mercaptoetanol provocan la desnaturalización de las proteínas presentes. Las proteínas fueron luego corridas en geles de poliacrilamida (12%) y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron primeramente con el anticuerpo monoclonal anti-PARP clivado (BD Biosciences) en una dilución 1:500. Luego las membranas, lavadas y bloqueadas, se expusieron al anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:3000. Las bandas específicas se revelaron utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL. Las mismas membranas fueron también incubadas con un anticuerpo anti- β -actina como control de sembrado, en una dilución 1:1000. Las bandas obtenidas en los films de revelado se densitometraron empleando el programa ImageQuant.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). La significancia estadística se determinó mediante los test no paramétricos: *Wilcoxon signed rank test* o *Mann Whitney test* para comparar muestras pareadas o no pareadas respectivamente. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

a.- EFECTO DE LURBINECTEDIN SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE DADORES NORMALES

Con el objetivo de evaluar el efecto de Lurbinectedin (Lur) sobre células mononucleares humanas, éstas se obtuvieron a partir de sangre periférica de dadores sanos (n= 5 muestras) y se expusieron a tres concentraciones de la droga: 1, 10 y 100nM durante 24 ó 48 horas, tal como se describe en Materiales y Métodos. La muerte celular se evaluó por incorporación de 7-AAD y análisis por Citometría de flujo (Figura 8).

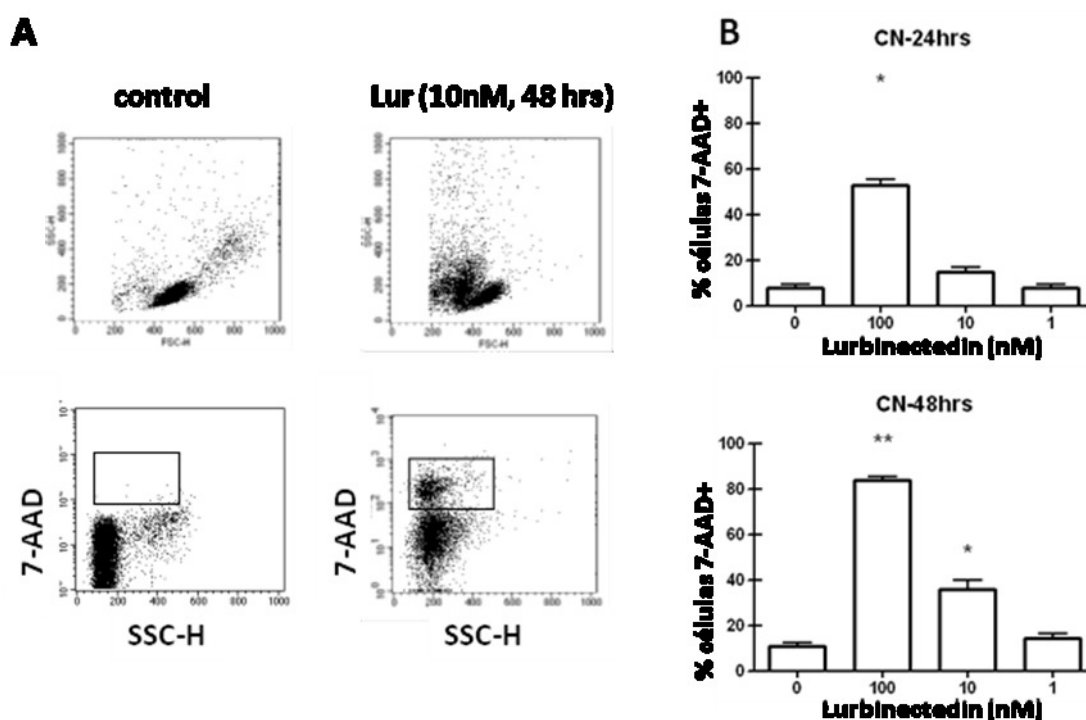


Figura 8. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre células mononucleares de sangre periférica de dadores sanos. La muerte celular se evaluó utilizando el colorante 7-AAD y análisis por citometría de flujo (A) dot plots de citometría de flujo, en la parte superior mostrando el tamaño celular versus la complejidad; y en la parte inferior mostrando el porcentaje de células positivas para 7-AAD en función de la complejidad celular. Son representativos de 5 muestras evaluadas. (B) Citotoxicidad inducida por Lurbinectedin medida como porcentaje de células que incorporaron 7-AAD a 24 y 48 horas de incubación con la droga o vehículo como control. Los valores se expresan como media \pm ES de n= 5. Las diferencias significativas en comparación a la incubación en ausencia de la droga se demarcan con (*) sobre la barra.

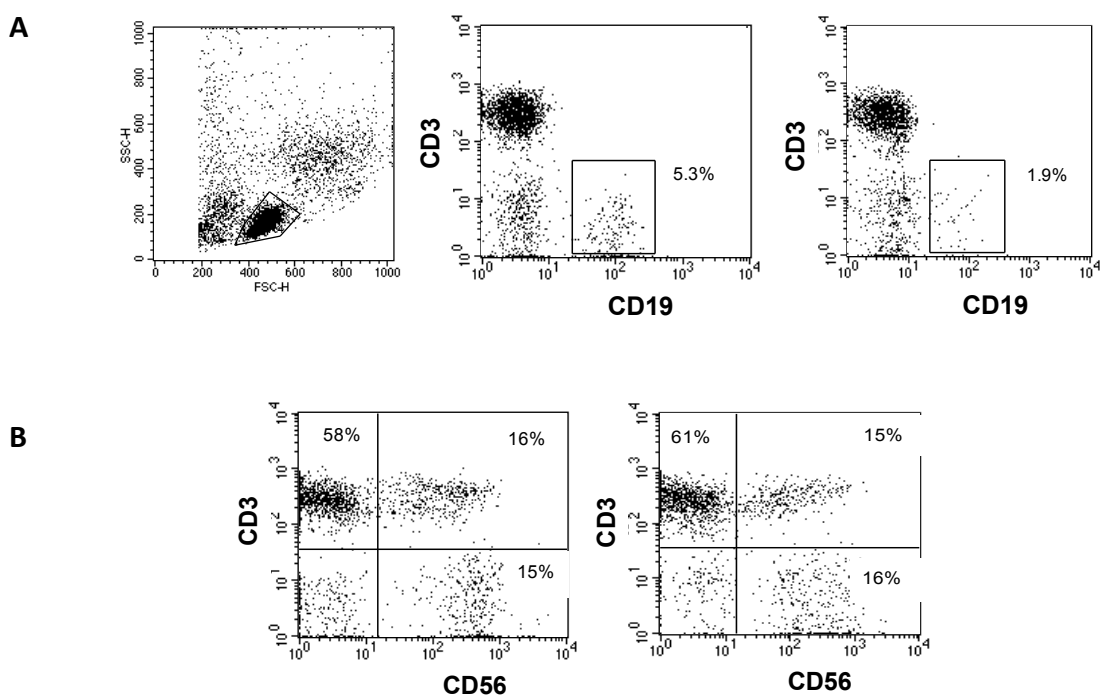
En la Figura 8, panel A se muestran gráficos de dot plots representativos de células controles o expuestas a Lur 10 nM por 48 hs. En los gráficos inferiores se indica el porcentaje de células que se marcaron con 7-AAD. Como puede observarse en el

panel B, a las 24 horas de incubación con la droga, sólo se obtuvieron porcentajes significativos de muerte celular con la concentración de 100nM, mientras que a las 48 horas de tratamiento, Lur a una concentración de 10nM indujo valores significativos de muerte celular.

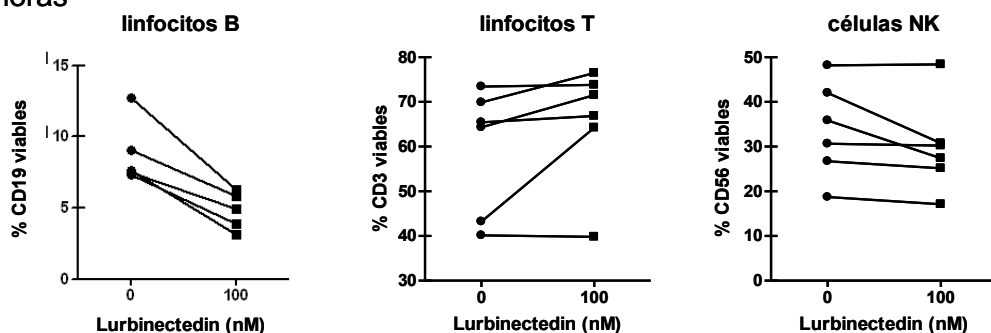
Teniendo en cuenta que las células mononucleares totales comprenden distintas poblaciones leucocitarias que podrían tener una sensibilidad diferencial a Lur, se decidió investigar el efecto de la droga sobre las distintas subpoblaciones utilizando una concentración de 100 nM a 24 horas de cultivo, y una concentración de 10 nM a 48 horas de cultivo.

b.- EFECTO DIFERENCIAL DE LURBINECTEDIN SOBRE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE DADORES SANOS

Para evaluar la sensibilidad de las subpoblaciones linfocitarias a Lur se emplearon anticuerpos específicos dirigidos contra linfocitos T (anti-CD3), células NK (anti-CD56) y linfocitos B (anti-CD19), con posterior análisis mediante citometría de flujo en la región de células viables. Como se observa en la Figura 9, las células CD19⁺ son las más afectadas por el tratamiento ya que su proporción disminuye marcadamente dentro de la población de linfocitos viables tanto a las 24 horas como a las 48 horas; manteniéndose las proporciones de las poblaciones NK y T.



24 horas



48 horas

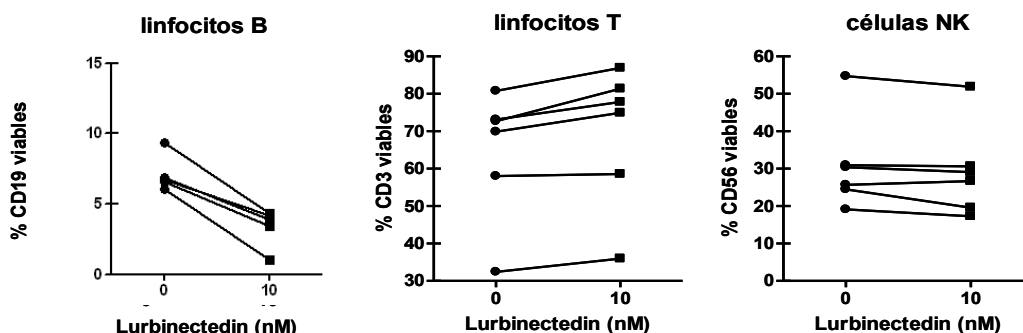


Figura 9. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre las distintas poblaciones de linfocitos de sangre periférica de donantes sanos. Las células mononucleares totales se incubaron con Lur 10 o 100nM durante 24 y 48 hs, y se incubaron con anti-CD3, anti-CD56 y anti-CD19 marcados con distintos fluorocromos. El análisis se realizó por citometría de flujo. En el panel A se muestran dot plots representativos de una muestra cultivada por 24 horas con Lur 100nM (a la derecha) o vehículo (a la izquierda). En el panel B se muestra la proporción de células viables de cada población luego de la incubación con Lur por 24 o 48 hs (n=6).

En la Figura 10 se grafican el conjunto de resultados obtenidos. Como puede observarse la proporción de linfocitos B y, en menor medida, de células NK disminuye dentro de la población viable expuesta a Lur, aumentando proporcionalmente la población T. Cabe señalar, sin embargo, que todas las poblaciones leucocitarias son sensibles a Lur y al cabo de 96 horas de cultivo con dosis tan bajas como 10 nM se alcanzan niveles de muerte del 100% (datos no mostrados).

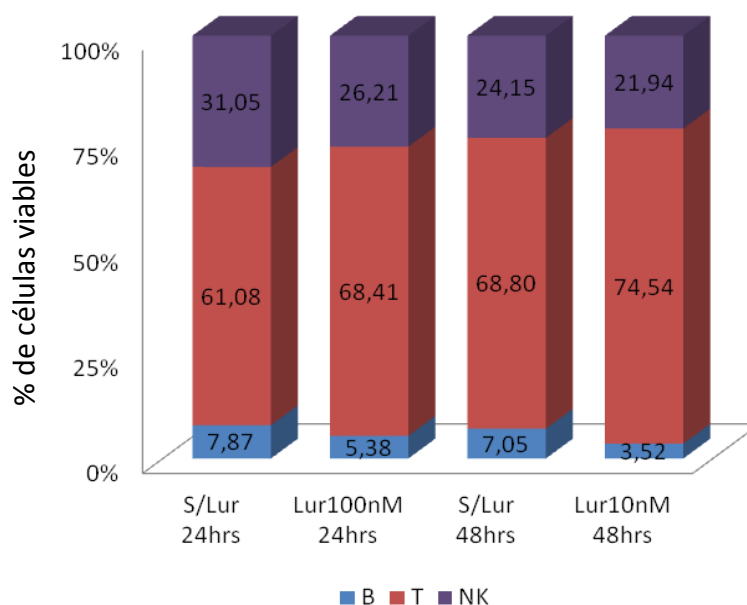


Figura 10. Proporción de linfocitos B, linfocitos T y células NK luego de la exposición de células mononucleares totales de sangre periférica de donantes sanos a Lurbinectedin durante 24 (Lur 100nM) o 48 (Lur 10nM) hs, n=6.

Las células mononucleares de sangre periférica están compuestas por monocitos además de las poblaciones linfocitarias antes nombradas. Cuando se analizó la actividad citotóxica de Lur se observó la desaparición total de la población de células monocíticas luego de la incubación por 48 hs a la concentración de 100nM (ver dot plots de tamaño versus complejidad granular de la Figura 8). Para corroborar estos datos se marcaron los monocitos con anti-CD14 que es un marcador específico de esta población. Como se observa en la Figura 11, luego de 24 horas de cultivo con Lur 100nM desaparecen las células CD14⁺, lo que demuestra la gran sensibilidad de los monocitos a la actividad citotóxica de la droga.

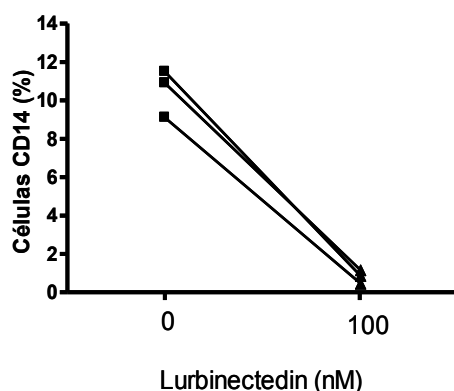


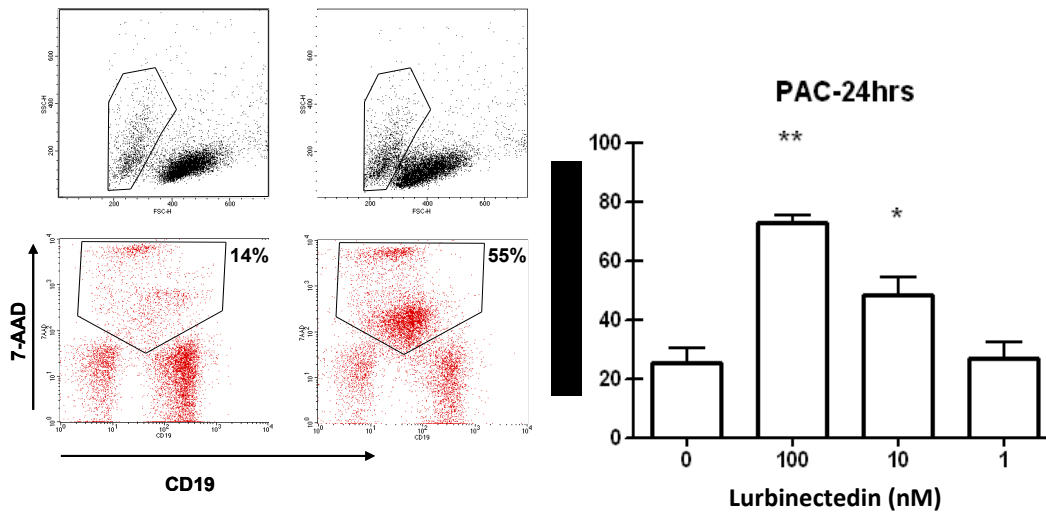
Figura 11. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre monocitos de donantes sanos. Células mononucleares de sangre periférica de dadores sanos se incubaron con Lur 100nM o vehículo durante 24 horas. La presencia de monocitos se evidenció marcando con anti-CD14. Se muestran los porcentajes de células CD14⁺ en tres muestras analizadas.

C.- EFECTO DE LURBINECTEDIN SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

El segundo objetivo del presente trabajo fue investigar la actividad citotóxica de Lurbinectedin en células B leucémicas de pacientes con LLC. Asimismo nos interesó analizar el efecto de la droga sobre las poblaciones leucocitarias no malignas de los pacientes ya que existe numerosa evidencia sobre anomalías en estas poblaciones ocasionadas fundamentalmente por la presencia de las propias células tumorales. A tal fin, se incubaron células mononucleares de sangre periférica de pacientes LLC con Lur en 3 concentraciones y se evaluó a 24 y 48 hs el porcentaje de células muertas con la metodología descrita para células de donantes sanos.

Como se muestra en la Figura 12, tanto a las 24 como a las 48 hs se observó que Lur induce un marcado aumento en los niveles de muerte de las células mononucleares de los pacientes LLC comparado con los niveles de muerte espontánea. Cabe señalar que estos últimos fueron mayores en comparación con lo observado en muestras de donantes sanos posiblemente porque se trata de muestras criopreservadas. De todas formas, Lur 10nM indujo niveles significativos de muerte celular a 24 hs a diferencia de lo observado para donantes sanos y se alcanzaron niveles de alrededor del 80% de muerte a 48 hs. Estos resultados sugieren que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes LLC son más susceptibles a Lur que la de donantes sanos.

A-



B-

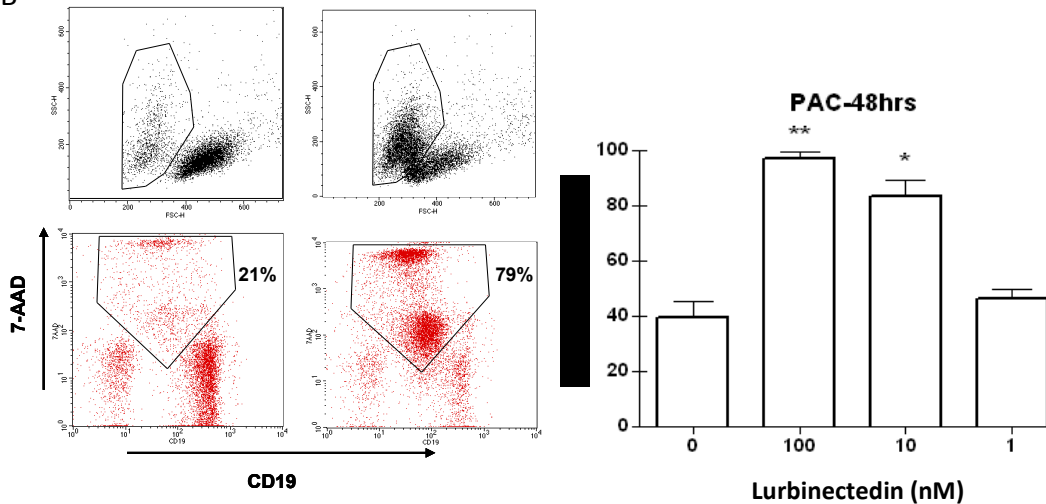


Figura 12. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes LLC. La muerte celular se evaluó utilizando el colorante 7-AAD y análisis por citometría de flujo (A) Se muestran a la izquierda dot plots representativos de citometría de flujo, en negro graficando el tamaño celular versus la complejidad y en rojo el porcentaje de células positivas para 7-AAD en función de la expresión de CD19. A la derecha se grafican los porcentajes de células que incorporaron 7-AAD luego de 24 hs en cultivo. Los valores se expresan como media \pm ES. Las diferencias significativas en comparación a la incubación en ausencia de la droga se demarcan con (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ sobre la barra. (B) Resultados obtenidos luego de 48 hs de cultivo.

d.- EFECTO DIFERENCIAL DE LURBINECTEDIN SOBRE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

Una posible explicación para la mayor susceptibilidad de las células mononucleares de los pacientes LLC en comparación a los donantes sanos es la proporción aumentada de linfocitos B malignos. Para corroborar que las células LLC son tan sensibles a la muerte por Lur como su contraparte normal realizamos marcaciones de las poblaciones T, NK y B luego del tratamiento *in vitro* con la droga.

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos en 6 muestras de pacientes analizadas. Se observa que a 24 hs con 10nM de Lur hay una tendencia leve a mayores niveles de muerte en las células CD19⁺, que se acentúa notablemente a 48 hs subiendo proporcionalmente la población de linfocitos T y en menor medida de células NK. Estos resultados nos permiten concluir que las células LLC son altamente sensibles a Lurbinectedin.

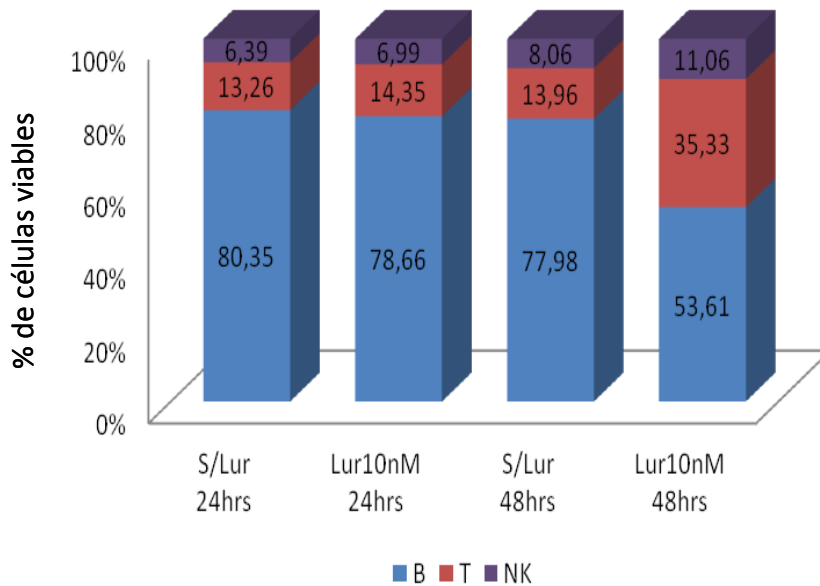


Figura 13. Proporción de linfocitos B (células LLC en más del 98%), linfocitos T y células NK luego de la exposición de células mononucleares totales de sangre periférica de pacientes LLC a Lurbinectedin 10nM durante 24 hs. Susceptibilidad de subpoblaciones linfocitarias de pacientes LLC a Lurbinectedin.

Como ocurrió con los monocitos de donantes sanos, el tratamiento con Lur indujo un alto porcentaje de muerte en las células CD14⁺ de los pacientes LLC alcanzándose un 100% de muerte a las 24 hs con concentraciones de 100nM y disminución significativa con Lur 10nM (Figura 14).

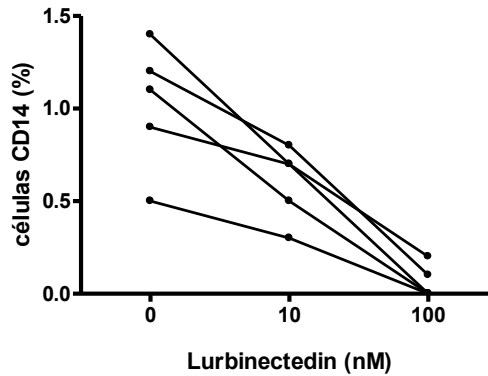


Figura 14. Actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre monocitos de pacientes LLC. Células mononucleares de sangre periférica de pacientes LLC se incubaron con Lur 10 o 100nM o con vehículo durante 24 horas. La presencia de monocitos se evidenció marcando con anti-CD14. Se muestran los porcentajes de células CD14⁺ en cinco muestras analizadas.

e.- EFECTO DE LURBINECTEDIN SOBRE LAS CÉLULAS DE TIPO NODRIZA (*NURSE-LIKE CELLS*)

Considerando el alta sensibilidad de los monocitos a Lurbinectedin, y sabiéndose que las NLC diferenciadas *in vitro* provienen de la diferenciación de los monocitos de los pacientes LLC, se hizo evidente la necesidad de evaluar el efecto citotóxico de la droga sobre esta población celular que cumple un papel protector sobre las células leucémicas. A tal fin, se diferenciaron NLC por cultivo durante 2 semanas de células mononucleares periféricas de pacientes LLC. Posteriormente se separaron las células no adherentes constituidas en más del 90% por células LLC y se expusieron las NLC a Lur 100nM durante 6 hs. Finalmente se lavaron las células NLC exhaustivamente para eliminar todo rastro de la droga y se volvieron a agregar las células no adherentes, reincubándose por 24 y 48 hs. El porcentaje de células no adherentes muertas se evaluó usando 7-AAD. En los pocillos controles, tanto a 24 como a 48 horas, el porcentaje de células no adherentes viables se mantuvo relativamente estable, lo que indica que las NLC son capaces de proteger a las células leucémicas de la apoptosis espontánea. Por el contrario, en los pocillos que contenían NLC expuestas por 6 hs a Lur, el porcentaje de células no adherentes viables disminuyó significativamente, aún cuando estas células no fueron incubadas en ningún momento con la droga (Figura 15). Estos resultados sugieren que concentraciones bajas de Lur que no serían capaces de inducir *per se* la muerte de las células leucémicas pueden afectar indirectamente a la población maligna al privarlas de las señales de sobrevivencia que reciben de las NLC.

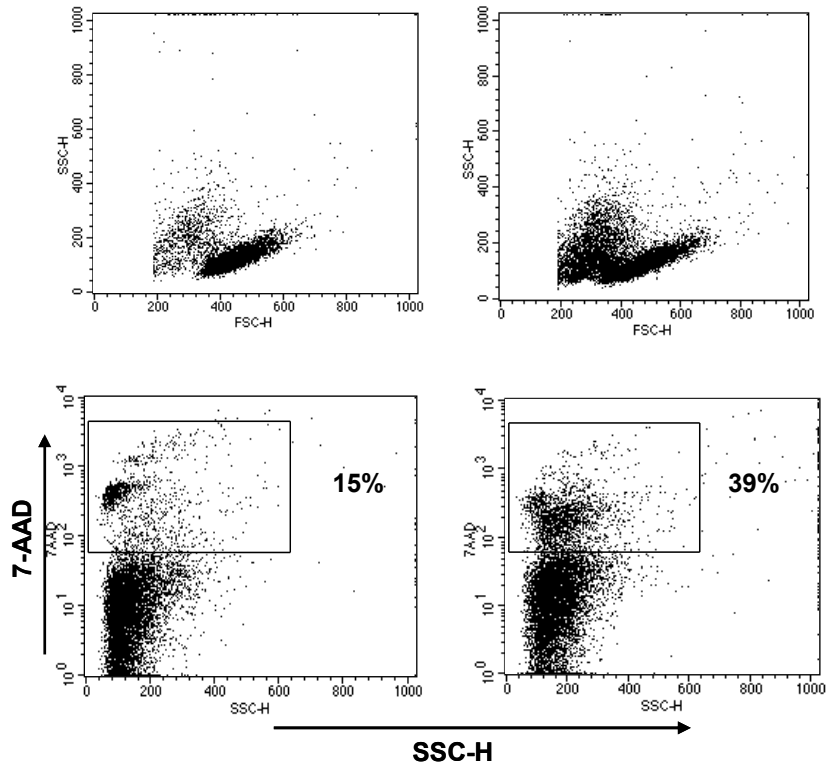


Figura 15. La actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre NLC afecta la viabilidad de las células B leucémicas. Se diferenciaron NLC a partir de células mononucleares periféricas (10^6 /ml) de pacientes LLC por cultivo en placas de 12 pocillos durante 2 semanas. Luego de retirar las células no adherentes (> 90% células B leucémicas), se expusieron las NLC por 6 hs a Lur 100nM o vehículo. Las células no adherentes se agregaron a las NLC tratadas o no con la droga y se cultivaron durante 24 o 48 hs más. La viabilidad de las células no adherentes se evaluó por exclusión de 7-AAD y análisis por citometría de flujo. Se muestran dot plots representativos de 24 hs de cultivo, n=2.

f.- EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE γ H2AX EN CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

Como se señalara anteriormente, los agentes que inducen la ruptura de la doble hélice de ADN como Lur provocan la fosforilación de la histona H2AX dando lugar a la forma γ H2AX que se acumula en los sitios de daño (19). Para investigar si este mecanismo es operativo en células LLC expuestas a Lur se evaluó la expresión de γ H2AX por citometría de flujo según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en Figura 16 y Tabla 1.

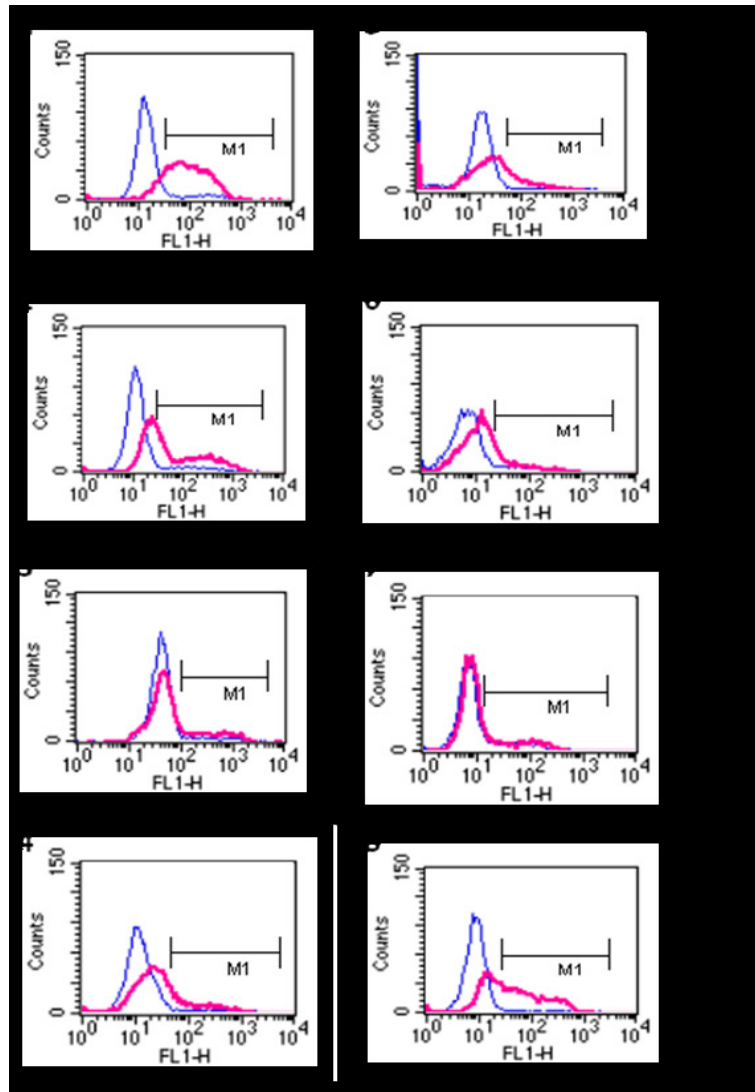


Figura 16. Efecto de la Lurbinectedin sobre la expresión de γ H2AX en células LLC. Células mononucleares totales de pacientes LLC se cultivaron por 24 hs con Lur 10nM (línea rosa) o vehículo (línea azul). La expresión de γ H2AX en células CD19⁺ se evaluó por citometría de flujo. Histogramas representativos de las 8 muestras LLC evaluadas. M1: porcentaje de células que expresan γ H2AX.

Como puede verse en la Tabla 1, la expresión de γ H2AX en células LLC cultivadas en condiciones controles varía entre las 8 muestras de pacientes LLC analizadas (rango 0,7-13,3). No obstante, en todas se apreció un aumento significativo por exposición a Lur durante 24 hs. Es interesante señalar que el aumento en los niveles de expresión de γ H2AX no correlaciona necesariamente con la expresión basal ya que algunos pacientes, como los números 6 y 7 que expresaron porcentajes basales altos de γ H2AX, alcanzaron niveles bajos de expresión a 24 hs, mientras que otros como el número 8 con expresión basal muy baja mostraron alta sensibilidad a Lur. Sería interesante en un futuro indagar las causas de este comportamiento diferente.

Tabla 1: Efecto de la Lurbinectedin sobre la expresión de γ H2AX en células LLC. Se muestran los porcentajes de células LLC que expresan γ H2AX luego de 24 hs incubadas con vehículo o Lur 10 nM (valores de M1 de la Figura 16).

Paciente #	Porcentaje de células que expresan γ H2AX	
	vehículo	Lur 10 nM
1	7,0	77,4
2	6,3	50,5
3	7,5	21,4
4	2,0	19,4
5	1,3	20,4
6	9,2	18,0
7	13,3	20,6
8	0,7	52,1

g.- INDUCCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE PARP POR LURBINECTEDIN EN CÉLULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

Por último y con el objetivo de profundizar en el mecanismo mediante el cual Lur induce la muerte de las células LLC se determinó si era capaz de clivar PARP. Esta enzima nuclear cumple un papel relevante en la reparación del ADN y es clivada por caspasa 3 una vez desencadenada la apoptosis. Es decir que la fragmentación de PARP es una indicación directa de inducción de apoptosis por la vía de las caspasas. El ensayo para determinar la fragmentación de PARP por Western blot se realizó empleando extractos proteicos provenientes de células mononucleares periféricas (>90% células B leucémicas) de pacientes LLC, cultivadas en presencia y ausencia de Lur 10 nM tal como se describe en Materiales y Métodos. En todos los pacientes testeados se apreció la aparición de la banda correspondiente al PARP fragmentado en las muestras tratadas con Lur (Figura 17) lo que confirma que la droga induce la apoptosis de las células B leucémicas. En la Figura 18 se muestran la relación PARPf/actina para cada una de las muestras analizadas. Estos resultados se expresan

en unidades arbitrarias obtenidas luego de realizar la densitometría de las bandas y analizarlas con el programa ImageQuant.

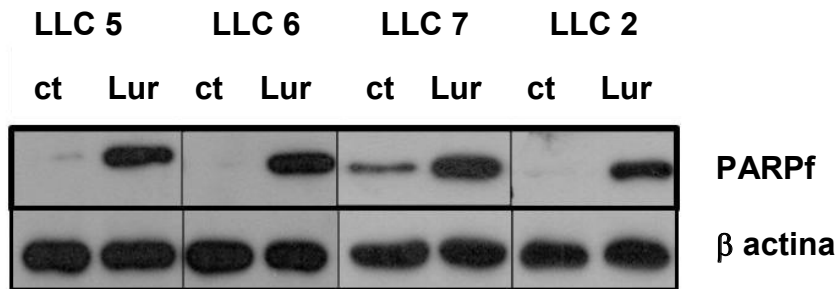


Figura 17. Efecto de Lurbinectedin sobre la expresión de PARP fragmentado (PARPf) en células mononucleares periféricas de pacientes LLC. Células mononucleares periféricas (5×10^6) de pacientes LLC se cultivaron por 36 horas en presencia de Lur 10nM o vehículo como control. Se prepararon lisados proteicos y se evaluó la expresión de PARPf y β actina por Western blot tal como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran bandas representativas de 4 de 8 pacientes estudiados con resultados comparables.

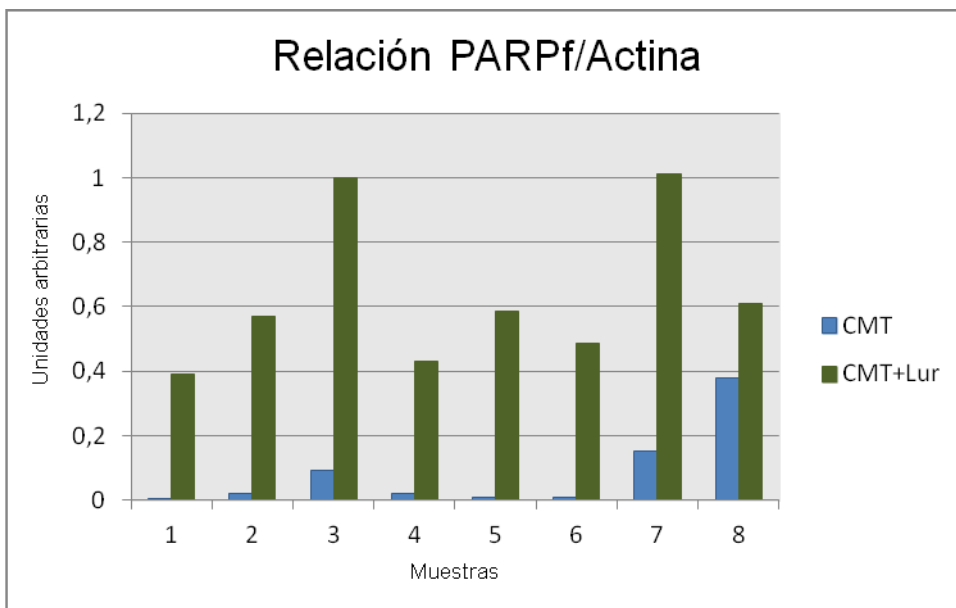


Figura 18. Efecto de Lurbinectedin sobre la expresión de PARPf en células mononucleares periféricas de pacientes LLC. La intensidad de las bandas obtenidas por Western blot según se muestra en la Figura 17 se cuantificó utilizando el programa ImageQuant. Se muestran la relación PARPf/β actina en unidades arbitrarias para cada muestra evaluada. CMT: células mononucleares totales.

DISCUSIÓN

Las investigaciones actuales para el desarrollo de moléculas anti-tumorales novedosas han abierto las puertas a sustancias, como las Ecteinascidinas, que forman aductos con el ADN, rompiendo la continuidad de la doble hebra e interfiriendo con la maquinaria de reparación nuclear, lo que inequívocamente lleva a las células a apoptosis. Dentro de las más interesantes están Trabectedin y Lurbinectedin; las similitudes estructurales que presentan ambas moléculas justifican la semejanza de su actividad biológica (12 ; 37). No obstante existen ciertas diferencias entre ambas, en particular su actividad farmacocinética, cuyas causas aún no han sido dilucidadas.

Siendo la Leucemia Linfática Crónica o LLC el tipo de leucemia del adulto más frecuente en Occidente, y considerando que en los últimos años se ha hecho evidente la importancia de las células no malignas presentes en el microambiente tumoral (formado dentro de los órganos linfoides) para la evolución de la neoplasia, nos propusimos estudiar la actividad citotóxica de Lurbinectedin sobre las diferentes poblaciones leucocitarias. Nuestro objetivo general fue determinar si existen diferencias en la sensibilidad de estas poblaciones a la droga tanto en donantes sanos como en pacientes LLC.

En primer lugar, demostramos que todas las poblaciones de células mononucleares periféricas son susceptibles a Lurbinectedin de manera dosis-dependiente y a medida que aumenta el tiempo de incubación. Sin embargo observamos diferencias en los niveles citotóxicos entre las distintas poblaciones celulares. Lurbinectedin presentó mayor actividad citotóxica sobre los linfocitos B y monocitos; y mantuvo relativamente estables las proporciones de linfocitos T y células NK a tiempos cortos de exposición y dosis bajas. Esta menor sensibilidad de los linfocitos T y las células NK a Lurbinectedin es sin duda una ventaja en el caso del tratamiento de los pacientes con LLC quienes presentan una inmunosupresión característica que se acentúa con la terapia anti-neoplásica (26). De hecho, las fallas funcionales de la respuesta inmune se asocian con infecciones bacterianas y virales que constituyen la principal causa de morbi/mortalidad de estos pacientes (33). Por

otra parte, la mayor sensibilidad de los linfocitos B, tanto normales como leucémicos, es una característica muy significativa de la Lurbinectedin ya que podría constituir un buen agente terapéutico para la LLC.

Entre todas las poblaciones leucocitarias evaluadas en este trabajo, la que mostró mayor susceptibilidad a la Lurbinectedin fue la de los monocitos. Es importante señalar que en los últimos años se ha revelado el rol crucial que cumplen las células de estirpe mieloide, en particular los macrófagos, en la evolución del cáncer. A pesar de ser células del sistema de defensa, los monocitos (sus precursores) son reclutados y transformados en el tejido tumoral en células inmunosupresoras (37). En tumores sólidos, estas células conocidas como macrófagos asociados al tumor (TAM) promueven la progresión de la enfermedad al generar soporte remodelando la matriz extracelular, induciendo angiogénesis y favoreciendo la supervivencia, proliferación e invasión de las células tumorales. Este comportamiento es regulado por las señales dentro del microambiente tumoral (37). En ensayos realizados por Allavena y colaboradores en 2012, se demostró que Trabectedin es altamente eficiente en la inducción de la apoptosis en TAMs. En modelos murinos de tumores, Trabectedin disminuye el número de monocitos circulantes en sangre periférica e inhibe el reclutamiento de los mismos al tejido tumoral (38 ; 39)). Estos resultados se condicen con el efecto supresor de Lurbinectedin sobre los monocitos humanos descrito en este trabajo.

En el caso de la LLC, si bien no se ha descrito la presencia de TAM, las células de estirpe mieloide cumplen un papel relevante en la patología, ya que numerosas evidencias señalan la participación de las células de tipo nodriza (NLC) en la supervivencia de las células leucémicas. Como se señalara en los antecedentes, las NLC se encuentran en los órganos linfáticos secundarios de los pacientes LLC y pueden generarse *in vitro* por cultivos prolongados de monocitos y células leucémicas. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que las NLC son muy sensibles a Lurbinectedin y, más importante aún, que su muerte resulta en la muerte de las células leucémicas. De esta forma, concentraciones muy bajas de la droga podrían afectar de manera indirecta la viabilidad de las células LLC al eliminar a las células mieloides que

favorecen su supervivencia a través de la secreción de factores solubles y de la interacción con la membrana plasmática.

¿Cómo explicar las diferencias en la susceptibilidad a Lurbinectedin observada entre las distintas poblaciones leucocitarias? Como la mayoría de los agentes alquilantes, Lurbinectedin ingresa por difusión al interior celular y no requiere ser metabolizada para ser activa. Por lo tanto, las diferencias en la sensibilidad habría que buscarlas fundamentalmente en las vías de reparación del daño al ADN desencadenado. A nuestro conocimiento no hay trabajos que comparen las vías de reparación entre las distintas poblaciones de leucocitos. Estudios recientes demuestran que los linfocitos B en reposo y los macrófagos son deficientes en la maquinaria NER (40 ; 41). Por otra parte, un interesante trabajo de Bauer y colaboradores (42) reportó que los monocitos presentan una deficiencia en su capacidad para reparar las rupturas de la doble hélice del ADN lo que los hace susceptibles al estrés oxidativo. Dado que las Ecteinacidinas inducen apoptosis a través de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (43), es posible que la mayor sensibilidad de los monocitos a Lurbinectedin esté relacionado, al menos en parte, con los defectos en las vías de reparación.

En cuanto al mecanismo de acción de Lurbinectedin en las poblaciones estudiadas, tanto las características de tamaño como las de complejidad granular observadas en los análisis de citometría de flujo indican que se trata de la inducción de apoptosis. Por otro lado y debido a que el mecanismo de acción de Lurbinectedin está vinculado a la inducción de quiebres en la doble hélice del ADN, evaluamos el incremento de γ H2AX en las muestras de pacientes, posterior a la incubación de éstas con la droga. Se hizo evidente que, a pesar de que en todos los casos hubo incremento en la concentración de γ H2AX, existe variabilidad entre los pacientes LLC, justificada por la heterogeneidad particular de esta patología y la falta de proliferación de estos linfocitos aberrantes. En análisis reportados por Romano *et al* (12), al evaluar la cinética de la concentración de γ H2AX en dos líneas celulares proliferantes (AA8 y UV96) con leves variaciones entre ellas, se observó que al incubarlas por una hora con Trabectedin o con Lurbinectedin, aumenta γ H2AX principalmente en la fase S del ciclo

celular, duplica su concentración a la hora y se sostiene por cuatro horas luego del lavado de la droga.

Un evento capaz de quebrar la continuidad de la doble cadena de ADN es el daño más importante de los que pueden ocurrirle al material genético, por ello conduce a la muerte celular si no es reparado a tiempo por las enzimas correspondientes (44). En todas aquellas muestras de pacientes LLC enfrentadas a Lurbinectedin (10nM) por 36 horas se hizo visible la aparición de una banda con el peso molecular correspondiente a PARP clivado por Western blot. PARP es una proteína regulatoria celular que, una vez desencadenado el clivaje de caspasas por inducción de la apoptosis, está inhabilitada para cumplir su rol reparador del daño genético. Por lo tanto, una vez que la droga ha ingresado al núcleo celular y se han acumulado los daños a la doble cadena de ADN, la célula indefectiblemente entra en apoptosis, se clivan las caspasas y la molécula de PARP, resultando en que los mecanismos de reparación en los que participa no se puedan llevar a cabo.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que Lurbinectedin es capaz de inducir citotoxicidad en leucocitos a concentraciones nanomolares que son clínicamente relevantes (45). La alta susceptibilidad de los linfocitos B malignos de pacientes LLC alienta el inicio de estudios preclínicos para la utilización de Lurbinectedin en esta patología. Actualmente, este agente antineoplásico está siendo evaluado en ensayos clínicos de fase II/III para cáncer de ovario refractario o resistente a la terapia standard con cisplatino (46). Asimismo, se está llevando a cabo un ensayo clínico fase I para pacientes con tumores sólidos multitratados de mama, tumores ginecológicos, de cabeza y cuello y ciertos tipos de cáncer de pulmón (47). En relación a las neoplasias hematológicas, a mediados de 2013 comenzó el reclutamiento de pacientes con leucemia aguda avanzada para iniciar un estudio clínico fase I a fin de determinar la dosis máxima tolerada de Lurbinectedin y caracterizar el perfil farmacocinético y farmacogenómico en estos pacientes (48). En todos estos casos se trata de tumores muy agresivos, que mostraron ser refractarios a otros regímenes terapéuticos y, por consiguiente el objetivo es la eliminación directa de las células malignas. Nuestros resultados indican que además de la actividad citotóxica sobre el

tumor es relevante investigar la susceptibilidad de las células no malignas que colaboran con la supervivencia y progresión de las células leucémicas.

REFERENCIAS

1. Mergny JL, Lacroix L. *Analysis of thermal melting curves*. Oligonucleotides. 2003;13(6):515-37.
2. Stucki M, Stagljar I, Jónsson ZO, Hübscher U. *A coordinated interplay: proteins with multiple functions in DNA replication, DNA repair, cell cycle/checkpoint control, and transcription*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;65:261-98.
3. Bueren-Calabuig JA, Giraudon C, Galmarini CM, Egly JM, Gago F. *Temperature-induced melting of double-stranded DNA in the absence and presence of covalently bonded antitumour drugs: insight from molecular dynamics simulations*. Nucleic Acids Res. 2011 Oct;39(18):8248-57.
4. Guan Y, Sakai R, Rinehart KL, Wang AH. *Molecular and crystal structures of ecteinascidins: potent antitumor compounds from the Caribbean tunicate Ecteinascidia turbinata*. J Biomol Struct Dyn. 1993 Apr;10(5):793-818.
5. Manzanares I, Cuevas C, García-Nieto R, Marco E, Gago F. *Advances in the chemistry and pharmacology of ecteinascidins, a promising new class of anti-cancer agents*. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2001 Nov;1(3):257-76.
6. Cuevas C, Francesch A. *Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem*. Nat Prod Rep. 2009 Mar;26(3):322-37.
7. Puthongking P, Patarapanich C, Amnuoyopol S, Suwanborirux K, Kubo A, Saito N. *Chemistry of ecteinascidins. Part 2. Preparation of 6'-O-acyl derivatives of stable ecteinascidin and evaluation of cytotoxicity*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2006 Jul;54(7):1010-6.
8. Jimeno J, Aracil M, Tercero JC. *Adding pharmacogenomics to the development of new marine-derived anticancer agents*. J Transl Med. 2006 Jan 9;4:3.

9. Leal JF, Martínez-Díez M, García-Hernández V, Moneo V, Domingo A, Bueren-Calabuig JA, Negri A, Gago F, Guillén-Navarro MJ, Avilés P, Cuevas C, García-Fernández LF, Galmarini CM. *PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent in vitro and in vivo anti-tumour activity*. Br J Pharmacol. 2010 Nov;161(5):1099-110.
10. Soares DG, Machado MS, Rocca CJ, Poindessous V, Ouaret D, Sarasin A, Galmarini CM, Henriques JA, Escargueil AE, Larsen AK. *Trabectedin and its C subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells*. Mol Cancer Ther. 2011 Aug;10(8):1481-9.
11. Ratain MJ, Elez ME, Szyldergemajn S, Geary D, Kang SP, Maraculla T. *First-in-man phase I study of PM01183 using an accelerated titration design*. Eur J Cancer Suppl 2010; 8: 2.
12. Romano M, Frapolli R, Zangarini M, Bello E, Porcu L, Galmarini CM, García-Fernández LF, Cuevas C, Allavena P, Erba E, D'Incalci M. *Source. Comparison of in vitro and in vivo biological effects of trabectedin, lurbinectedin (PM01183) and Zalypsis® (PM00104)*. Int J Cancer. 2013 Nov;133(9):2024-33.
13. Fisher DE. *Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold*. Cell 1994 Aug 26;78(4):539-42.
14. Serhan CN, Savill J. *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. Nat Immunol. 2005 Dec;6(12):1191-7.
15. Fiandalo MV, Kyprianou N. *Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis*. Exp Oncol. 2012 Oct;34(3):165-75.
16. Wong RS. *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. J Exp Clin Cancer Res. 2011 Sep 26;30:87.

17. Davar D, Beumer JH, Hamieh L, Tawbi H.. *Role of PARP Inhibitors in Cancer Biology and Therapy*. *Curr Med Chem*. 2012;19(23):3907-21.
18. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. *Histone H2A variants H2AX and H2AZ*. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12:162–169.
19. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. *H2AX: the histone guardian of the genome*. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:959–967.
20. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. *γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. *Nucleic Acids Res*. 2008 October; 36(17): 5678–5694.
21. Caligaris-Cappio F. *Inflammation, the microenvironment and chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*. 2011 Mar;96(3):353-5.
22. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. *Chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*. 2005 Feb 24;352(8):804-15.
23. Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, Montserrat E, Hallek M: ESMO Guidelines Working Group. *Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*. 2011 Sep;22 Suppl 6:vi50-4.
24. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/: Nov 2011 SEER data submission.
25. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. *Chronic lymphocytic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:163-83.

26. García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L. *Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development*. Ann Hematol. 2012 Jul;91(7):981-96.
27. Davids MS, Burger JA. *Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Open J Hematol. 2012;3(S1).
28. Burger JA. *Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:96-103.
29. Herreros B, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. *Lymphoma microenvironment: culprit or innocent?* Leukemia. 2008 Jan;22(1):49-58.
30. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. *Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome*. Blood. 2001 Jan 1;97(1):256-63.
31. Bojarska-Junak A, Hus I, Sieklucka M, Wasik-Szczepanek E, Mazurkiewicz T, Polak P, Dmoszynska A, Rolinski J. *Natural killer-like T CD3+/CD16+CD56+ cells in chronic lymphocytic leukemia: intracellular cytokine expression and relationship with clinical outcome*. Oncol Rep. 2010 Sep;24(3):803-10.
32. Le Garff-Tavernier M, Decocq J, de Romeuf C, Parizot C, Dutertre CA, Chapiro E, Davi F, Debré P, Prost JF, Teillaud JL, Merle-Beral H, Vieillard V. *Analysis of CD16+CD56dim NK cells from CLL patients: evidence supporting a therapeutic strategy with optimized anti-CD20 monoclonal antibodies*. Leukemia. 2011 Jan;25(1):101-9.
33. Young JA. *Epidemiology and management of infectious complications of contemporary management of chronic leukemias*. Infect Disord Drug Targets. 2011 Feb;11(1):3-10.
34. Wiltshaw E. *Chemotherapy in chronic lymphocytic leukaemia*. Clin Haematol. 1977 Feb;6(1):223-35.

35. Keating MJ. *Fludarabine phosphate in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol. 1990 Oct;17(5 Suppl 8):49-62.
36. Casak SJ, Lemery SJ, Shen YL, Rothmann MD, Khandelwal A, Zhao H, Davis G, Jarral V, Keegan P, Pazdur R. *U.S. Food and drug administration approval: rituximab in combination with fludarabine and cyclophosphamide for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia*. Oncologist. 2011;16(1):97-104.
37. Monk BJ, Dalton H, Benjamin I, Tanović A. *Trabectedin as a new chemotherapy option in the treatment of relapsed platinum sensitive ovarian cancer*. Curr Pharm Des. 2012;18(25):3754-69.
38. Allavena P, Mantovani A. *Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment*. Clin Exp Immunol. 2012 Feb;167(2):195-205.
39. Allavena P, Germano G, Belgiovine C, D'Incalci M, Mantovani A. *Trabectedin: A drug from the sea that strikes tumor-associated macrophages*. Oncoimmunology. 2013 Jun 1;2(6):e24614.
40. Hyka-Nouspikel N, Lemonidis K, Lu WT, Nouspikel T. *Circulating human B lymphocytes are deficient in nucleotide excision repair and accumulate mutations upon proliferation*. Blood 2011; 117: 6277-6286
41. Nouspikel T, Hanawalt PC. *Impaired nucleotide excision repair upon macrophage differentiation is corrected by E1 ubiquitin-activating enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:16188-16193.
42. Bauer M, Goldstein M, Christmann M, Becker H, Heylmann D, Kaina B. *Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress*. PNAS , 2011; 108: 21105–21110
43. Atmaca H, Bozkurt E, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. *A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells*. Toxicol Lett. 2013 ;221:128-136.ç

44. Davis AJ, Chen DJ. *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining*. *Transl Cancer Res*. 2013 Jun;2(3):130-143.
45. Van Kesteren C, Cvitkovic E, Taamma A, Lazaro LL, Jimeno JM, Guzman C, Mathot R, Schellens J, Misset JL, Brain E, Hillebrand M, Rosing H, Beijnen JH. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Novel Marine-derived Anticancer Agent Ecteinascidin 743 in a Phase I Dose-finding Study*. *Clin Cancer Res* 2000;6:4725-4732.
46. Berton-Rigaud D., Alexandre J., Provansal M., Casado A., Gonzalez Martin A., Fernández C. *Lurbinectedin (PM01183) activity in platinum-resistant/refractory ovarian cancer patients. Preliminary results of an ongoing two-stage phase II study*. *Ann Oncol* (2012) 23/9.
47. WEB: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01831089>
48. WEB: <http://www.mayo.edu/research/clinical-trials/CTS-00103585>

Trabajo Original realizado por:

Lic. María Mercedes De Los Ríos
Tesisista

Dra. Mirta Giordano
Directora