



Universidad de Buenos Aires - Facultad de Farmacia y Bioquímica

Tesis de Doctorado

**MODULACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR
TRÓXIDO DE ARSÉNICO EN LEUCEMIAS MEDIANTE
COMBINACIÓN CON MGI32 Y DROGAS EPIGENÉTICAS.
RELACIÓN CON LA MUERTE MEDIADA POR BNIP3**

Tomás Lombardo

Director: Dr. Guillermo Blanco

Co-Director: Dra. Élica Álvarez

**Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr. Ricardo Margni – CONICET -
Cátedra de Inmunología - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA**

2016

Dr. Guillermo Blanco

Dra. Élica Álvarez

Bioq. Tomás Lombardo

“Solo sirven las conquistas científicas sobre la salud si éstas son accesibles al pueblo”.

Dr. Ramón Carrillo

Quisiera agradecer profundamente a todas aquellas personas que, de una u otra forma, me ayudaron a llegar hasta esta instancia:

A mis “viejos”, por el sacrificio enorme que siempre hicieron por mí, por ser dos grandes ejemplos a seguir y dos pilares en los que siempre encontré apoyo.

A mis hermanas, Kari y Tati, por estar siempre ahí, por el aguante, por todos los recuerdos que compartimos, de chicos y de grandes.

A mis abuelas, Juanita y “la Nona”, por regalarme ese amor que sólo una abuela puede dar.

A Barbie, por estar al lado mío todos estos años, en las buenas y en las malas, por bancarme siempre y por esa energía inagotable que me empuja para adelante todos los días.

A mis tíos, primos, y sobrinos por el cariño y el apoyo que me dieron siempre y por saber que siempre voy a poder contar con ellos. En especial a Mateo y a mi ahijada, Cande, por esa magia y alegría que sólo tienen los chicos.

A Elena, Marilú y Mati, que desde el primer momento me adoptaron como a uno más de la familia.

A mis directores, Guille y Eli, por haber confiado en mí, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, por todo lo que me enseñaron, por estar siempre dispuestos a dar una mano y por la paciencia.

A mis amigos del LIT, Su, Silvi, Mati, Mari, Cin y Martín, por las charlas científicas y no tanto, por los mates, por la buena onda, por la ayuda desinteresada que siempre están dispuestos a dar y por ser el mejor grupo en el que alguien pueda estar. Muy especialmente a Vicky y Dani, que se hicieron cargo de mí desde el primer día, me enseñaron todo sin guardarse nada y me regalaron su conocimiento y su amistad.

A todos los integrantes del IDEHU, por la solidaridad y predisposición que demostraron cada vez que necesité algo y por hacer que cada día de trabajo sea una sorpresa. En especial a Lucho, por esas “charlas de alto vuelo” en el citómetro.

A la Dra. Laura Kornblihtt, por ser nuestra mano derecha en el Hospital de Clínicas, por el entusiasmo y la predisposición que la caracterizan.

A mis amigos “de la vida”, Bruno, Fabi, Dari, Juan y Emi, por todos los momentos vividos y por estar ahí siempre que los necesité.

A mis “amigos de la Facu”, el Ruso, Nacho, Ger, Fede y el Pokle, por hacer más llevaderas las cursadas, por esas juntadas de estudio y esas cábalas después de los finales.

A la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el soporte financiero que permitió la realización de este trabajo.

Y a todos los que con su aporte científico o humano contribuyeron a la construcción de esta tesis doctoral...

¡Muchas Gracias!

A mi abuelo Alberto.

Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente incluidos en las publicaciones detalladas a continuación:

Publicaciones

Synergism of arsenic trioxide and MG132 in Raji cells attained by targeting BNIP3, autophagy, and mitochondria with low doses of valproic acid and vincristine. Cavaliere V, Lombardo T, Costantino S, Kornblihtt L, Alvarez EM, Blanco G **European Journal of Cancer**. 50: 3243-3261 (2014)

Synergism between arsenite and proteasome inhibitor MG132 over cell death in myeloid leukaemic cells U937 and the induction of low levels of intracellular superoxide anion. Lombardo T, Cavaliere V, Kornblihtt L, Alvarez E, Blanco G.A. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 258: 351-366 (2012)

Capítulos de libro

Lombardo T, Anaya L, Kornblihtt L, Blanco G.A. "Median effect dose and combination index analysis of cytotoxic drugs using flow cytometry"; en "**Flow Cytometry**" Editor Ingrid Schmid, Flow Cytometry Core Laboratory, UCLA, USA InTech-Open Publisher, Rijeka, Croatia pp. 393-420 (2012) ISBN 979-953-307-355-1

[3H]-TdR	Timidinatriada
(5-CMF)	5-clorometil-fluoresceína
(AMR)	área mitocondrial relativa
(BNIP3)	BCL2/adenovirus E1B 19 kDaprotein-interactingprotein 3
(BSA)	seroalbúmina bovina
(CAPE)	Caffeicacidphenethylester
(CCCP)	carbonil-cianuro-m-clorofenil-hidrazona
(CDR)	curvas dosis respuesta
(CE01)	concentración sub-citotóxica
(CE50)	concentración efectiva 50
(CI)	índice de combinación
(CI50)	efecto medio de inhibición de proliferación
(CMSP)	células mononucleares de sangre periférica
(cpm)	cuentas por minuto
(CPNM)	cluster perinuclear mitocondrial
(Cyt c)	citocromo c
(Dm)	dosis de efecto citotóxico medio
(ERAD)	degradación asociada a retículo endoplasmico
(ERO)	especies reactivas del oxígeno
(Fa)	fracción de células muertas o fracción afectada
(FDA)	fluoresceína diacetato
(FITC)	fluoresceína
(FSC)	dispersión de luz frontal
(GPx)	glutación peroxidasa
(GSH)	glutación
(GSSG)	glutación disulfuro
(HDAC)	histona-desacetilasas
(HE)	hidroetidina
(HIF-1a)	Hipoxia Inducing Factor-a
(HRP)	peroxidasa
(IC)	índice de cambio
(IC95%)	intervalos de confianza del 95%
(IP)	ioduro de propidio
(LC3)	microtubule-associated light chain 3
(LLC)	leucemia linfática crónica
(MDC)	monodancyl-cadaverina
(MEM)	membrana externa mitocondrial
(MF)	mediana de fluorescencia
(Mfn)	mitofusinas
(MM)	masa mitocondrial
(MTKred)	Mito Tracker Red
(NA)	Naranja de Acridina
(NAO)	naranja de nonil-acridina
(OXPHOS)	Fosforilación oxidativa
(PBS)	fosfato buffer salino

(PGC-1 α)	Peroxisomeproliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
(PML)	leucemia aguda promielocítica
(PMM)	potencial de membrana mitocondrial
(PTP)	poro de transición de permeabilidad
(RE)	retículo endoplásmico
(RFP)	red fluoresceinprotein
(SE)	error estándar
(SFB)	suero fetal bovino
(SSC)	dispersión de luz lateral
(TMRE)	tetrametil-hidrorodamina-etil-ester
(TOA)	trióxido de arsénico
(uaf)	unidades arbitrarias de fluorescencia
(VCR)	Vincristina
(VPA)	ácido valproico

Resumen

La búsqueda de alternativas terapéuticas a los fármacos actualmente utilizados como tratamiento de leucemias y linfomas, ha llevado a un uso cada vez más frecuente de terapias combinadas. Este tipo de tratamiento propone el uso simultáneo de dos o más drogas, teniendo como objetivo la combinación de dos o más mecanismos de acción diferentes que se complementen para lograr el efecto deseado. De esta manera se pretende lograr una mayor efectividad terapéutica, junto a una reducción de la dosis utilizada de cada compuesto, logrando así una disminución en la frecuencia y gravedad de los efectos adversos generados. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios que ocurren en la potencia citotóxica del trióxido de arsénico (TOA), un compuesto utilizado como monodroga en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, al combinarse con el inhibidor de proteasoma MG132, en las líneas celulares humanas U937 (leucemia promonocítica) y Raji (linfoma de Burkitt). Se evaluaron además los mecanismos por los cuales se producen dichos cambios de potencia al combinar las dos drogas. La combinatoria TOA+MG132 fue sinérgica en la línea a U937. Este sinergismo resultó ser dependiente de la generación de bajos niveles de anión superóxido (O_2^-) y bajos niveles de GSH intracelulares. Por el contrario, la combinatoria TOA+MG132 resultó antagónica en la células Raji. Pudo determinarse que el antagonismo TOA+MG132 en la línea Raji, ocurre debido a que las células eliminan selectivamente las mitocondrias dañadas mediante mitofagia, y además tienen silenciado el gen de BNIP3 (una proteína de la familia bcl2 involucrada en la muerte mediada por TOA). Finalmente, mediante un aumento en la expresión de BNIP3 utilizando drogas con acción epigenética y la inhibición del flujo mitofágico, se logró una interacción sinérgica entre TOA y MG132 en la línea Raji. Concluimos que el sinergismo TOA+MG132 en células U937, se debe a la falta de activación de la respuesta de GSH, que depende a su vez de niveles elevados de O_2^- como señal. Por otro lado, el antagonismo TOA+MG132 en células Raji, se debe a la eliminación de mitocondrias dañadas por mitofagia, lo cual constituye un poderoso mecanismo de resistencia al cual serían adictas ciertas neoplasias. Sugerimos que los fármacos con acción de bloqueo sobre este mecanismo, serían de gran importancia en el diseño de combinaciones, para aumentar la potencia citotóxica y la selectividad sobre las células neoplásicas, a la vez que permitirían reducir los efectos adversos sobre las células normales. Consideramos que los resultados derivados de este trabajo de tesis, acerca de las modificaciones en la potencia citotóxica que ocurren al combinar dos o más drogas, y el análisis personalizado de la respuesta de cada paciente en particular, permitirán contribuir a mejorar la eficacia de la terapia antineoplásica.

Contenido

1	Introducción	1
1.1	Arsénico e inhibidores del proteasoma en terapias dirigidas y combinadas.....	1
1.1.1	Los mecanismos de toxicidad del arsénico y su utilización como fármaco antileucémico.....	1
1.1.2	La resistencia al TOA y las combinaciones con inhibidores del proteasoma	2
1.1.3	Terapias dirigidas y combinadas	3
1.1.4	Muerte celular como biomarcador de efecto de fármacos dirigidos	6
1.1.5	Muerte regulada: la competencia entre mecanismos de iniciación de la muerte celular y las respuestas celulares de stress.....	7
1.2	Citotoxicidad por arsénico y mecanismos celulares de resistencia	9
1.2.1	BNIP3, una proteína pro-apoptótica que puede ser modulada por el TOA.....	9
1.2.2	Antecedentes de expresión aumentada de BNIP3 en neoplasias.....	9
1.2.3	El silenciamiento epigenético de BNIP3 previene la inducción de muerte celular en neoplasias. Controversia sobre el rol dual pro-muerte celular o pro-supervivencia de BNIP3	10
1.3	Autofagia	11
1.4	Mitofagia, una forma selectiva de autofagia	11
1.4.1	La mitofagia como parte de un sistema de control de calidad mitocondrial	12
1.4.2	La biogénesis de nuevas mitocondrias completa el “turnover” mitocondrial....	13
1.5	La respuesta antioxidante en la homeostasis y supervivencia celular.....	15
1.6	El estudio de las combinaciones de fármacos citotóxicos	16
1.6.1	El método del efecto medio y el índice de combinación (CI).....	16
1.6.2	¿Cómo medir la influencia de las respuestas de stress en la muerte regulada? La CE50 como indicador del punto de equilibrio “Noxa vs respuesta celular de stress”	18
1.6.3	Adición de las células neoplásicas a las respuestas de stress celular, CE50 y selectividad farmacológica.....	18
	Objetivos	20

Objetivos generales.....	20
Objetivos específicos.....	21
2 Materiales y Métodos	22
2.1 Cultivos celulares.....	22
2.2 Obtención y procesamiento de células de pacientes	22
2.3 Drogas y Reactivos	22
2.4 Tratamientos	23
2.5 Determinación de muerte celular mediante citometría de flujo con Fluoresceína diacetato (FDA) y Ioduro de Propidio (IP)	23
2.6 Inhibición de la proliferación celular por incorporación de Timidina tritiada [³ H]-TdR	24
2.7 Cálculo de ecuación de efecto medio y análisis de interacción de drogas	24
2.8 Determinación de la producción de O ²⁻ por citometría de flujo	25
2.9 Determinación del contenido de Glutación reducido (GSH) por citometría de flujo..	26
2.9.1 Determinación del estado del PMM por citometría de flujo	26
2.10 Detección de cambios en la masa mitocondrial (MM) por citometría de flujo	27
2.11 Determinación simultánea del contenido de autofagosomas y muerte celular mediante citometría de flujo	27
2.12 Detección de ARNm de BNIP3 mediante RT-PCR.....	28
2.13 Detección de proteínas por Western Blot.....	29
2.13.1 Preparación de extractos proteicos	29
2.13.2 Preparación de muestras, electroforesis y transferencia	29
2.13.3 Revelado de proteínas específicas	29
2.14 Microscopía de Fluorescencia	30
2.15 Detección de la expresión de BNIP3 por Inmunofluorescencia.....	30
2.16 Estudio de la distribución mitocondrial y cálculo del área mitocondrial relativa (AMR)	31
2.17 Detección de autofagosomas por Microscopía de fluorescencia	31
2.18 Transfección con pRFP-LC3 y análisis de colocalización con MDC.....	32

2.19	Doble marcación MDC-Naranja de Acridina (NA) y análisis de colocalización	32
2.20	Doble marcación MDC-MTKred y análisis de colocalización.....	33
2.21	Doble marcación anti-BNIP3-MTKred y análisis de colocalización	33
2.22	Análisis estadístico	33
3	Resultados	34
3.1	Efecto citotóxico de TOA y las combinatorias sobre la líneas U937 y Raji.....	34
3.1.1	Determinación de viabilidad “célula por célula” mediante citometría de flujo .	34
3.1.2	Efecto citotóxico de las drogas individuales sobre las líneas celulares.....	36
3.1.3	Efecto citotóxico de las combinatorias sobre las líneas celulares.	40
3.1.4	Determinación del tipo de interacción obtenida para las combinatorias	44
3.1.5	Efecto de las drogas individuales sobre la proliferación celular	47
3.1.6	Efecto de las combinaciones sobre la proliferación celular	50
3.2	Modificación en la producción de anión superóxido inducida por TOA, MG132 y CAPE en el rango de dosis con efecto citotóxico.....	53
3.2.1	Efecto individual de TOA, MG132 y CAPE en la producción de $O_2^{\cdot-}$	53
3.2.2	Efecto combinado de TOA, MG132 y CAPE en la producción de $O_2^{\cdot-}$	57
3.2.3	Modificaciones en los niveles de GSH inducidos por TOA y MG132.....	61
3.2.4	El sinergismo TOA+MG132 en la línea U937 se asocia a bajos niveles de $O_2^{\cdot-}$	66
	69
3.3	Expresión de BNIP3 y su relación con el efecto citotóxico inducido por TOA+MG132	70
3.3.1	Expresión diferencial de la proteína BNIP3 en células U937 y Raji.....	70
3.3.2	Aumento de la expresión de mensajero de BNIP3 en las células Raji por tratamiento con Ácido Valproico (VPA)	73
3.3.3	Aumento de la expresión de la proteína BNIP3 en células Raji luego del tratamiento con VPA.....	75
3.3.4	VPA no sensibiliza la línea Raji a la acción citotóxica de TOA+MG132	77
3.4	Inducción de autofagia por TOA y MG132 en las células Raji y U937.....	81
3.4.1	Autofagia basal en las células Raji y U937.....	81

3.4.2	Cuantificación de autofagosomas mediante citometría de flujo utilizando MDC 84	
3.4.3	Determinación de flujo autofágico.....	87
3.4.4	MDC marca Autofagosomas pero no lisosomas	91
3.4.5	Inducción de aumento en la autofagia por TOA+MG132	96
3.4.6	Sinergismo TOA+MG132 en la línea Raji en presencia de VPA+VCR	98
3.5	Eliminación de mitocondrias como forma de resistencia al TOA combinado con MG132	102
3.5.1	Efecto de los tratamientos sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM)	102
3.5.2	Cambios en la distribución mitocondrial inducidos por TOA+MG132.....	104
3.5.3	Cambios en la masa mitocondrial inducidos por los tratamientos.....	108
3.5.4	Efecto de VPA+VCR subletal sobre la masa y la localización mitocondrial	110
3.5.5	Eliminación selectiva de mitocondrias por autofagia y control de calidad mitocondrial	119
3.6	Evaluación de la interacción de fármacos citotóxicos en células de pacientes con neoplasias hematológicas	124
3.6.1	<i>Caso 1</i> - leucemia mieloide aguda (FAB M6).....	125
3.6.2	<i>Caso 2</i> - Linfoma de células T del adulto	127
3.6.3	<i>Caso 3</i> – Leucemia linfática crónica	129
4	Discusión	131
4.1	Acerca de la potencia citotóxica relativa y los mecanismos de resistencia a fármacos citotóxicos	131
4.1.1	La curva dosis respuesta (CDR) como evaluación de potencia citotóxica: balance entre los factores que inducen muerte celular y las respuestas de estrés celular que promueven la supervivencia	131
4.1.2	Resistencia, sensibilidad y potencia citotóxica evaluada mediante la CDR	133
4.1.3	Potencia citotóxica y selectividad: la importancia para las terapias dirigidas y combinadas	133
4.1.4	Estudio de la potencia citotóxica en combinaciones de fármacos	134

4.1.5	Cambios en la potencia relativa de fármacos combinados y respuestas de estrés celular	135
4.2	Sinergismo y antagonismo entre TOA y MG132 en células U937: el rol de los niveles de O_2^- y una respuesta protectora que incrementa el nivel de GSH	136
4.2.1	La producción de ERO en los mecanismos de muerte celular inducida por TOA	136
4.2.2	El incremento de ERO no necesariamente se asocia a una mayor potencia citotóxica: en células U937 bajo O_2^- se asocia a bajo GSH y sinergismo, alto O_2^- se asocia a alto GSH y antagonismo	136
4.2.3	TOA y MG132 son sinérgicos en cuanto al efecto citotóxico y antagónicos en el efecto inhibitorio de la proliferación	138
4.3	TOA y MG132 son antagónicos en células Raji en cuanto al efecto citotóxico, pero la caída en la potencia relativa no puede explicarse por los niveles de GSH	139
4.3.1	TOA y MG132 reducen los niveles de GSH y aumentan O_2^- en las células Raji	139
4.3.2	TOA y MG132 no tienen efecto sobre el PMM en las células Raji	140
4.4	Las causas del antagonismo TOA+MG132 en células Raji y su reversión farmacológica	140
4.4.1	¿Es posible identificar el mecanismo que causa la caída de potencia relativa citotóxica en la combinación TOA+MG132 en células Raji?	140
4.4.2	La autofagia y la sobreexpresión de BNIP3 en la muerte celular inducida por TOA	141
4.4.3	Autofagia y expresión de BNIP3 en células U937 y Raji; silenciamiento epigenético de BNIP3 como forma de resistencia citotóxica	141
4.4.4	¿Es posible incrementar la expresión de BNIP3 por drogas epigenéticas en células Raji? Y en tal caso ¿es eso suficiente para revertir el antagonismo entre TOA y MG132?	142
4.4.5	¿Es la autofagia un mecanismo celular que promueve la supervivencia frente el efecto citotóxico de TOA y MG132?	142
4.4.6	La mitofagia es una respuesta que promueve la supervivencia de las células Raji y causa una reducción en la potencia relativa de TOA y MG132 combinadas	143

4.4.7	El bloqueo de la mitofagia junto a la expresión de BNIP3 en células Raji, causa un aumento en la potencia relativa de TOA y MG132, suficiente como para pasar de un antagonismo a un sinergismo	144
4.5	¿Es posible evaluar la interacción TOA y MG132 en cuanto al efecto citotóxico en células de pacientes? Y en tal caso cual es el efecto de VPA y VCR?	146
4.6	Acerca de la regulación recíproca entre el sistema ubiquitina proteasoma y la mitofagia	147
4.7	La interacción TOA+MG132 como biomarcador de efecto y la influencia de mecanismos de resistencia	148
5	Conclusiones Parciales	149
	Sección I	149
	Efecto citotóxico de TOA y las combinatorias sobre las líneas U937 y Raji	149
	Sección II	150
	Modificación en la producción de anión superóxido inducida por TOA, MG132 y CAPE en el rango de dosis con efecto citotóxico	150
	Sección III	151
	Expresión de BNIP3 y su relación con el efecto citotóxico inducido por TOA+MG132	151
	Sección IV	152
	Inducción de autofagia por TOA y MG132 en las células Raji y U937.....	152
	Sección V	153
	Eliminación de mitocondrias como forma de resistencia al TOA combinado con MG132153	
	Sección VI	155
	Evaluación de la interacción de fármacos citotóxicos en células de pacientes con neoplasias hematológicas	155
6	Conclusiones Finales	156
7	Referencias	159
8	ANEXO I	177
8.1	Evaluación de interacción de fármacos citotóxicos por el método del índice de combinación utilizando citometría de flujo como método de alto rendimiento	177

8.1.1	Evaluación de viabilidad mediante citometría de flujo.....	177
8.1.2	Marcación fluorescente de células vivas y muertas.....	177
8.1.3	Viabilidad y apoptosis	178
8.1.4	La construcción de una curva dosis-respuesta citotóxica	179
8.1.5	Cálculo de la dosis media y la ecuación de efecto medio	181
8.1.6	Dosis umbral, dosis media y eficacia máxima	183
8.1.7	Comparación de dos drogas.....	183
8.1.8	Evaluación del efecto combinado de dos drogas usando relaciones molares fijas 184	
8.1.9	Análisis gráfico.....	185
8.1.10	Cálculo del índice de combinación (CI)	185
8.1.11	Comentarios adicionales.....	193
8.1.12	Referencias Anexo I.....	193

1 Introducción

1.1 Arsénico e inhibidores del proteasoma en terapias dirigidas y combinadas

1.1.1 Los mecanismos de toxicidad del arsénico y su utilización como fármaco antileucémico

El arsénico es un metaloide que causa efectos nocivos en la salud humana y animal ([Celik et al., 2008](#)). Entre estos se incluyen varias formas de cáncer y enfermedades cardiovasculares ([Steinmaus et al., 2014a](#); [Steinmaus et al., 2014b](#); [Wang et al., 2007](#)). En varias regiones de la Argentina se han identificado elevados niveles de arsénico en el agua de consumo y su asociación con neoplasias malignas ([Hu et al., 2009](#)). Por esta razón, resulta importante caracterizar las acciones biológicas del arsénico y conocer los mecanismos moleculares que determinan sus efectos adversos sobre la salud. De manera paradójica, el arsénico puede tener una toxicidad selectiva sobre células neoplásicas, como ocurre en el caso de ciertos tipos de leucemias y linfomas. Tanto es así, que el trióxido de arsénico (TOA), se encuentra actualmente aprobado para el tratamiento de la leucemia aguda promielocítica (PML). El tratamiento con TOA de la PML logra remisiones completas en más de 90% de los casos, aún en pacientes resistentes al ácido transretinoico ([Hu et al., 2009](#); [Ravandi et al., 2009](#)). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los arsenicales inducen efectos citotóxicos selectivos sobre células neoplásicas no se conocen completamente. Por ejemplo, el TOA no es efectivo en otras leucemias ya que se requiere una dosis muy elevada para alcanzar un nivel de efecto citotóxico tal que lo convierta en un tratamiento útil para dichas patologías. El conocimiento de los mecanismos moleculares de toxicidad, muchas veces aporta un fundamento racional a la combinación de drogas, al permitir que se ataquen varios blancos simultáneamente, logrando así un incremento de la potencia relativa de cada droga o sinergismo. Por eso en los últimos años se han dedicado numerosos estudios a entender los mecanismos moleculares de toxicidad del TOA, tanto en células normales como neoplásicas, para luego evaluar los efectos combinados junto a otras drogas como es el caso de los inhibidores del proteasoma, los agentes hipometilantes y los inhibidores de histona deacetilasa. El conocimiento de varios mecanismos moleculares afectados por éstas y otras drogas, como por ejemplo la inhibición de NF-κB, la producción incrementada de especies reactivas del oxígeno (ERO) ([Dasmahapatra et al., 2006](#);

Zanotto-Filho *et al.*, 2010) o la regulación positiva de genes de supresión tumoral (Chen *et al.*, 2010), contribuye a respaldar el uso de combinación de drogas y anticipar la posible eficacia demostrable en estudios clínicos de fase II (Shiozawa *et al.*, 2009).

El inhibidor de proteasoma Bortezomib es aplicado con éxito para tratar a pacientes con mieloma múltiple (Ocio *et al.*, 2008), y nuevas generaciones de inhibidores de la proteasoma están en desarrollo. Mientras que la efectividad clínica de la mayoría de los nuevos fármacos dirigidos ha sido limitada al ser utilizados de manera individual, podría mejorarse su eficacia mediante una combinación racional entre sí o con agentes convencionales (Chanan-Khan *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2007). Por ejemplo, arsénico 3+ no tiene ningún efecto como agente único en la leucemia de células T adultas pero puede alcanzar altas tasas de remisión completa cuando se combina con IFN α y zidovudina (Kchour *et al.*, 2009), y aunque arsenito no se recomienda como agente único en MDS de alto riesgo, al ser combinado con Ara-C dio lugar a la remisión completa, incluso en casos de mal pronóstico citogenético (Roboz *et al.*, 2008).

MG132 es un inhibidor del proteasoma que activa selectivamente apoptosis en varios tipos de células neoplásicas. Los inhibidores del proteasoma han demostrado aumento de la actividad cuando se combinan con varios de los nuevos agentes dirigidos a blancos moleculares específicos, incluyendo inhibidores de proteína desacetilasas, inhibidores de kinasas, inhibidores de farnesyltransferasa, inhibidores de la HSP-90, pan-inhibidores de la familia de proteínas Bcl-2 y otras clases de inhibidores específicos (Dai *et al.*, 2003; Karp *et al.*, 2005; Trudel *et al.*, 2007; Yanamandra *et al.*, 2006). Así entonces, los inhibidores del proteasoma en combinación con nuevas terapias dirigidas, tienen una actividad antitumoral aumentada y pueden superar de esta manera los mecanismos específicos celulares antiapoptóticos (Wright, 2010).

1.1.2 La resistencia al TOA y las combinaciones con inhibidores del proteasoma

El TOA induce apoptosis en la línea celular NB4 que es derivada de una PML, en un rango de concentraciones 0,5 a 1 μ M (Chen *et al.*, 1996; Momeny *et al.*, 2010). Por el contrario, en otras líneas celulares leucémicas mieloides como U937, HL60 y K562 se requieren concentraciones superiores a 2 μ M para inducir apoptosis. Por esta razón, estas líneas celulares son consideradas resistentes al TOA. Esta situación ha motivado que se realicen varios estudios en los últimos años, para identificar fármacos que puedan ser combinados con TOA y así sensibilizar a las células leucémicas, permitiendo la inducción de muerte celular en concentraciones menores, y el uso de dosis de TOA

clínicamente alcanzables (Peng *et al.*, 2010). El mecanismo de muerte celular inducida por TOA implica alteración mitocondrial y activación de apoptosis intrínseca con la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Jing *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998). Varios estudios han concluido que la mayor producción de ERO, sería un mecanismo fundamental para lograr un sinergismo con arsenito sobre los efectos de muerte celular (Li *et al.*, 2008a; Ramos *et al.*, 2005). Estos hechos promovieron el estudio de combinaciones de TOA con otros medicamentos dirigidos a la mitocondria, o que aumentan los niveles de ERO para inducir la muerte celular y vencer la resistencia de células leucémicas (Sanchez *et al.*, 2010). Además, los estudios mecanísticos han sugerido que la inhibición de NF-κB también puede ser crítica en la determinación de sinergismo en la muerte celular inducida por arsénico (Han *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008b). Sin embargo, en la mayoría de los casos las combinaciones de drogas activan numerosas vías efectoras y de señalización. Por esta razón es muy difícil anticipar el efecto neto que tendrá una determinada combinación en un amplio rango de dosis, basándose únicamente en el conocimiento de los mecanismos de muerte celular inducidos por cada droga.

1.1.3 Terapias dirigidas y combinadas

Las terapias dirigidas son una estrategia de tratamiento contra el cáncer, que tiene por objeto interferir con procesos de carcinogénesis, progresión del cáncer y ocurrencia de metástasis, afectando selectivamente a moléculas claves de las células neoplásicas (Armand *et al.*, 2007; Favoni *et al.*, 2011; Gross-Goupil *et al.*, 2010). Estas terapias dirigidas están apuntadas a pequeñas moléculas, que participan en diversos mecanismos que controlan la supervivencia celular, a través de proteínas celulares o vías de señalización (Mueller *et al.*, 2009; Zahorowska *et al.*, 2009). Las terapias dirigidas pueden ofrecer mayor eficacia, mayor selectividad y menor toxicidad (Fig. 1.1). Sin embargo, las vías y moléculas selectivas a menudo inducen la activación de mecanismos redundantes, estimulando así la aparición de células resistentes debido a la presión selectiva (Woodcock *et al.*, 2011). Esta es una de las razones por las que los efectos de fármacos dirigidos no son duraderos cuando se usan solos, resultando a menudo en resistencia y recaída clínica (Fig. 1.2). Exceptuando casos concretos, el uso de estos fármacos específicos como monoterapia no es recomendado debido a la falta de eficacia.

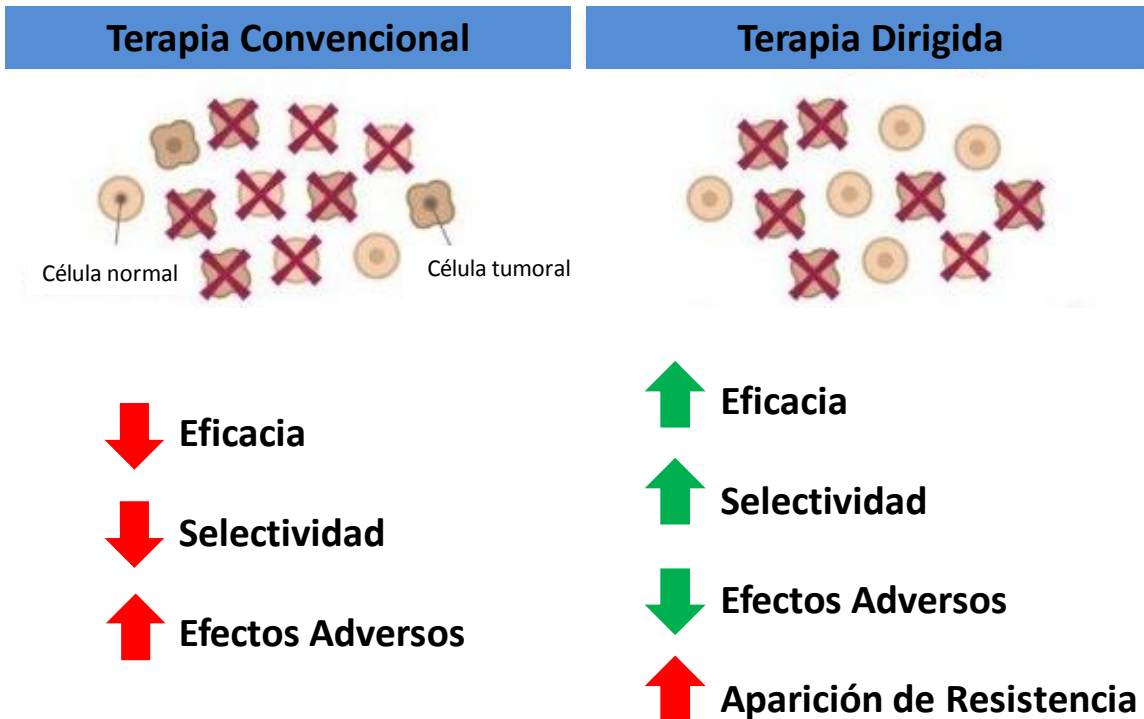


Figura 1.1 Quimioterapia convencional vs quimioterapia dirigida. En el panel izquierdo se esquematiza como los tratamientos quimioterápicos convencionales afectan no solo a las células tumorales sino también a las células normales. En el panel izquierdo se muestra como las terapias dirigidas solo actúan selectivamente sobre blancos específicos en la célula tumoral.

Sin embargo, la terapia combinada con fármacos dirigidos que apuntan a diferentes mecanismos de muerte celular, puede mejorar sensiblemente la eficacia y vencer la resistencia. Se han identificado diversas alteraciones genómicas y epigenéticas en células tumorales, que conducen a la proliferación desenfrenada, evasión de señales proapoptóticas, metástasis y resistencia a la muerte celular inducida por drogas. Estas alteraciones son esenciales para la progresión del cáncer y por lo tanto las estrategias de combinación con múltiples agentes dirigidos, pueden ser una terapéutica exitosa. En las estrategias de combinación vertical, dos o más fármacos apuntan a una misma vía en dos puntos diferentes, mientras que en combinaciones horizontales, los fármacos apuntan hacia

diferentes rutas de señalización intracelular, teniendo así la ventaja potencial de combinar agentes con efectos tóxicos no superpuestos (Gross-Goupil *et al.*, 2010).

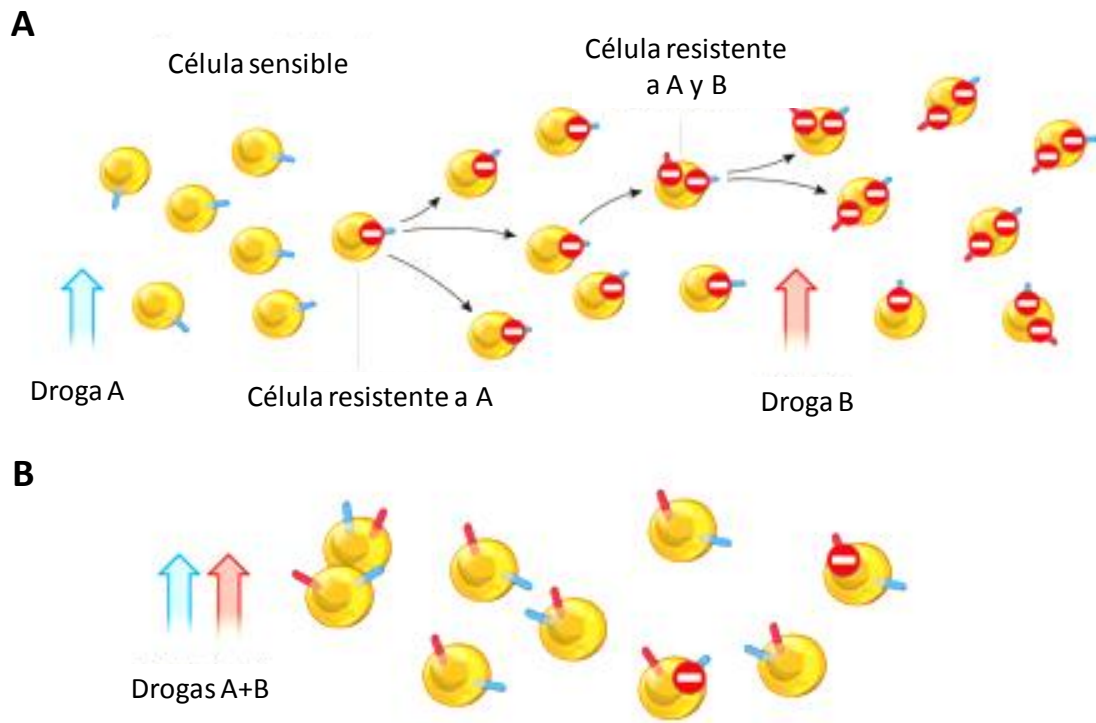


Figura 1.2. Tratamientos individuales vs tratamientos combinados. En A se esquematiza como en los tratamientos individuales una célula tumoral que desarrolla una mutación que le otorga resistencia al tratamiento adquiere una ventaja proliferativa con respecto a las demás. Luego de recurrir a otra terapia individual, la probabilidad de aparición de resistencia a esta segunda droga es la misma que en el primer caso. Con tratamiento combinado que se esquematiza en B, en el caso de que se adquiriera resistencia a alguna de las dos drogas, la célula permanece sensible a la otra, haciendo menos probable la aparición de resistencia al tratamiento combinado y aumentando la eficacia de la terapia (adaptado de (Komarova *et al.*, 2013)).

Los nuevos tratamientos requieren la investigación de los mecanismos de acción y de la sinergia de los tratamientos combinados, para mejorar el papel de los agentes farmacológicos dirigidos (Carew *et al.*, 2008; Mitsiades *et al.*, 2011). Una parte esencial de este esfuerzo, es evaluar combinaciones de fármacos específicos, incluidas las drogas en investigación (Dancey *et al.*, 2006).

Las terapias que combinan dos medicamentos están siendo evaluadas actualmente en una variedad de tumores. Se trata generalmente de pruebas con fármacos que tienen blancos diferentes, toxicidad no superpuesta y algunos fundamentos mecanísticos para justificar la evaluación (Belinsky *et al.*, 2011; Castaneda *et al.*, 2009; Eriksen *et al.*, 2009; Klosowska-Wardega *et al.*, 2010). Se espera que ocurra un aumento en el número de estos estudios en los próximos años, dada la creciente comprensión de las vías moleculares importantes en la progresión del cáncer (Woodcock *et al.*, 2011). Las interdependencias de las vías de señalización intracelulares de las células neoplásicas, están siendo cada vez más analizadas, y los pacientes son tratados de manera prácticamente personalizada en base al perfil de resistencia detectado para combinaciones de fármacos específico (Busch *et al.*, 2010; Derenzini *et al.*, 2009; Michiels *et al.*, 2011). Este enfoque puede facilitar el desarrollo de regímenes combinados optimizados para ciertos subtipos de tumor específicos, proporcionando así un potencial para el tratamiento a medida de los pacientes individuales, sobre la base de ciertas características genéticas y moleculares de la enfermedad.

1.1.4 Muerte celular como biomarcador de efecto de fármacos dirigidos

Muchos de los clásicos agentes quimioterapéuticos (agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, inhibidores de la topoisomerasa), bloquean la división celular al comprometer la replicación del ADN y detener la progresión del ciclo celular, o inhibir la mitosis, llevando eventualmente a la muerte celular (Foye, 1995; Goodman *et al.*, 2010). Los indicadores de la proliferación celular son biomarcadores de efecto adecuados para determinar si una combinación de estos agentes es sinérgica, aditiva o antagónica. Los biomarcadores utilizados para este propósito incluyen la incorporación de análogos de los nucleótidos como bromodeoxiuridina, o indicadores metabólicos subrogantes del número de células, como es el caso de los ensayos basados en sales de tetrazolio (Olszewska-Slonina *et al.*, 2004; Sims *et al.*, 2009). Sin embargo muchos de los nuevos agentes dirigidos interfieren con vías de supervivencia constitutivamente activas e inician la apoptosis, por influencia directa sobre las señales pro-apoptóticas (Citri *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007a). Además, la muerte celular autofágica y la necrosis programada están siendo activamente investigados como formas alternativas de muerte celular farmacológicamente relevantes (Berghe *et al.*, 2010; Bijnsdorp *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2010; Gozuacik *et al.*, 2007; McCall, 2010; Notte *et al.*, 2011; Paglin *et al.*, 2005; Platini *et al.*, 2010). Los estudios de combinación se deben llevar a cabo con biomarcadores de efecto que sean los más cercano posible, a los mecanismos conocidos de las drogas individuales. Los biomarcadores

relacionados específicamente con inducción de muerte celular en las células tumorales, parecen ser los más adecuados para la evaluación de fármacos dirigidos (Cameron *et al.*, 2001; Facoetti *et al.*, 2008; Wesierska-Gadek *et al.*, 2005).

1.1.5 Muerte regulada: la competencia entre mecanismos de iniciación de la muerte celular y las respuestas celulares de stress

El término apoptosis ha sido durante más de una década sinónimo de muerte celular programada. Hoy sabemos que la necrosis puede ser también objeto de una regulación tan precisa como la apoptosis. Ya no es posible definir un mecanismo de muerte celular programada por las características bioquímicas o morfológicas (Galluzzi *et al.*, 2016; Karch *et al.*, 2015). El comité de nomenclatura sobre muerte celular 2015, ha enfatizado el concepto de *muerte regulada* como aquella muerte celular no fisiológica que ocurre cuando los mecanismos de resistencia, representados por distintos tipos de respuestas de stress, son superados, a la vez que se activan los mecanismos que inician la muerte celular, que se denomina entonces “muerte regulada”. El comité propone lo que denomina “modelo competitivo” de la muerte regulada, en el que las respuestas celulares de stress y los mecanismos iniciadores de la muerte celular operan concurrentemente (Galluzzi *et al.*, 2015). Este modelo competitivo es comparable a una balanza en la que el predominio de las respuestas de stress lleva a la sobrevida, mientras que el predominio de la noxa lleva a la muerte celular regulada (Fig. 1.3 A y B).

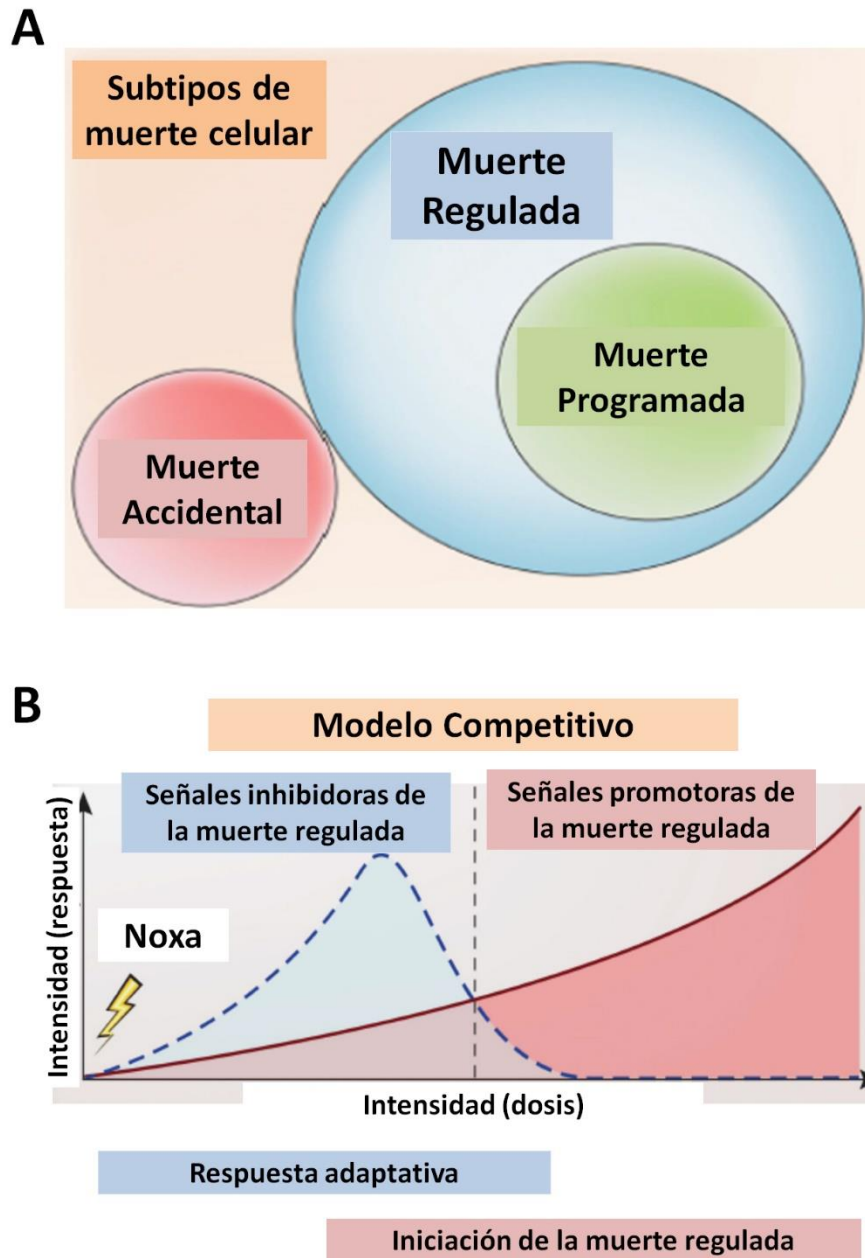


Figura 1.1 Modelo de competencia entre señales promotoras de la muerte regulada (por ej. fármacos mitocan como el TOA) y señales inhibitorias (por ej. autofagia y mitofagia). El panel A muestra que la muerte regulada puede ser en términos mecánicos similar a la muerte programada, incluyendo todas las formas de apoptosis y necroptosis, pero ocurre en circunstancias patológicas y es contrarrestada por las respuestas de stress celular de manera homeostática. El panel B muestra el modelo de competencia de la muerte regulada. (adaptado de la edición 2015 de las recomendaciones del comité internacional de nomenclatura sobre muerte celular, Galluzzi et al., 2015).

1.2 Citotoxicidad por arsénico y mecanismos celulares de resistencia

1.2.1 BNIP3, una proteína pro-apoptótica que puede ser modulada por el TOA

Muchos estudios han identificado a la mitocondria como posible blanco de los efectos del TOA, donde estimularía la apoptosis intrínseca (Lu *et al.*, 2014). BNIP3 (del inglés, BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) es una proteína asociada a la inducción de muerte celular en respuesta a la hipoxia. En células normales, la expresión de BNIP3 está controlada por Hipoxia Inducing Factor- α (HIF-1 α) y además representa uno de los genes más abundantes entre los inducidos por HIF-1 α . BNIP3 es un mediador de muerte celular en miocardiocitos, hepatocitos y neuronas (Webster *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007b). En estos estudios se demostró que el silenciamiento de BNIP3 suprimió la inducción de muerte por hipoxia. En los miocardiocitos, la expresión de BNIP3 está bloqueada por medio de la unión del factor de transcripción NF- κ B al promotor de BNIP3 (Baetz *et al.*, 2005). Esto se atribuye al reclutamiento de histona deacetilasa 1 al promotor por parte de NF- κ B conduciendo así a la supresión de la muerte celular inducida por hipoxia (Baetz *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2008). Cuando BNIP3 se sobreexpresa o se lo induce con estímulos de estrés, se localiza en la membrana mitocondrial por medio de su dominio de transmembrana (Chen *et al.*, 1999). Este dominio se integra en la membrana externa de la mitocondria causando un incremento en ERO, la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (PMM) (Kubasiak *et al.*, 2002; Vande Velde *et al.*, 2000). En neoplasias agresivas, la tolerancia a la hipoxia se asocia con capacidad metastatizante y pronóstico desfavorable. Las células neoplásicas localizadas en regiones hipóxicas habitualmente se vuelven resistentes a los agentes quimioterápicos y a la radioterapia (Martinive *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el efecto citotóxico selectivo del arsénico sobre células de glioma, depende de la regulación positiva de BNIP3 (Kanzawa *et al.*, 2005).

1.2.2 Antecedentes de expresión aumentada de BNIP3 en neoplasias

Si bien un gran número de estudios demostró que la sobreexpresión de BNIP3 induce muerte celular y que su silenciamiento muy frecuentemente bloquea la muerte en hipoxia, en varios modelos de estudio también se observó que podía haber expresión de esta proteína sin inducción de muerte celular. La expresión de BNIP3 se observó aumentada en cáncer de próstata (Shaida *et al.*, 2008), glioblastoma multiforme (Burton *et al.*, 2009), carcinoma de endometrio (Giatromanolaki *et al.*, 2004), carcinoma cervical uterino (Leo *et al.*, 2006), carcinoma de mama invasivo (Tan *et al.*, 2007), cáncer de pulmón (Giatromanolaki *et al.*, 2004), linfomas foliculares (Sington *et al.*, 2007) y

adenocarcinomas gástricos (Lee *et al.*, 2007). La expresión aumentada de BNIP3 frecuentemente se asoció con formas más agresivas de la enfermedad. Esto impulsó una serie de hipótesis para explicar la supresión del efecto de muerte BNIP3 tanto en neoplasias como en células normales expuestas a hipoxia severa. Una de ellas fue la acidificación del citoplasma como factor necesario para que BNIP3 conforme un poro de permeabilidad mitocondrial, tal como ocurriría en la hipoxia prolongada (Frazier *et al.*, 2006). Otra hipótesis fue la expresión de BNIP3 en localización nuclear, lo cual impediría su acción de disparador de la apoptosis intrínseca. Algunos autores observaron que la sobreexpresión de BNIP3 se asocia con aumento de la autofagia y propusieron que ésta sería la causa de muerte (Burton *et al.*, 2006), en tanto otros autores sostienen que la autofagia sería una forma de resistencia a la muerte celular inducida por BNIP3 (Hamacher-Brady *et al.*, 2007).

1.2.3 El silenciamiento epigenético de BNIP3 previene la inducción de muerte celular en neoplasias. Controversia sobre el rol dual pro-muerte celular o pro-supervivencia de BNIP3

El gen BNIP3 se encuentra silenciado en muchos tumores por mecanismos epigenéticos tales como la hipermetilación del promotor y la desacetilación de histonas. La expresión disminuida de BNIP3 resulta en una disminución de la muerte celular inducida por quimioterápicos, a la vez que se asocia a una menor sobrevida de los pacientes (Bacon *et al.*, 2007; Erkan *et al.*, 2005). Varios estudios han propuesto que el silenciamiento de BNIP3, permitiría a las células tumorales sobrevivir en un microambiente desfavorable como la hipoxia, en tanto que la restauración de la expresión de BNIP3 podría incrementar su sensibilidad al tratamiento quimioterápico (Ishida *et al.*, 2007; Murai *et al.*, 2005a). Esta situación contrasta con la de neoplasias en las cuales la expresión aumentada de BNIP3 es un marcador de formas agresivas. Más aún, el rol de BNIP3 en hipoxia es principalmente de protección en la etapa inicial de adaptación, pero si la hipoxia persiste el mecanismo de muerte se vuelve dominante y BNIP3 aparece como un mediador de la apoptosis intrínseca. Algunos autores han propuesto que la inhibición (por silenciamiento epigenético) de la muerte inducida por BNIP3, representaría una ventaja para las células neoplásicas. En líneas celulares pancreáticas, el gen BNIP3 se encontró silenciado por metilación de su promotor (Okami *et al.*, 2004). Cuando estas líneas fueron expuestas a hipoxia, no se observó inducción de BNIP3 y las células mostraron resistencia a la inducción de muerte. El tratamiento con azacitidina revirtió la metilación del gen BNIP3, restauró la expresión de dicha proteína y sensibilizó a las líneas pancreáticas a la muerte inducida por hipoxia. Otro estudio en pacientes con mieloma múltiple, demostró que la presencia de BNIP3 silenciado epigenéticamente se correlacionó con la disminución de la sobrevida (Heller *et al.*, 2008).

1.3 Autofagia

La autofagia (“comerse a sí mismo”), término acuñado por Duve y Wattiaux, es un proceso altamente conservado por el cual los componentes citoplasmáticos son secuestrados en autofagosomas (vacuolas con doble membrana) y entregados al lisosoma (autolisosomas) donde se degradan en un medio ácido (De Duve et al., 1966; Parzych et al., 2014). Como principal vía de reciclaje intracelular, la autofagia es crucial en la homeostasis celular y en la remodelación durante el desarrollo. Los elementos a reciclar son identificados mediante ubiquitinas transferidas por ligasas y la biogénesis de los autofagosomas requiere la intervención de proteínas reguladoras de autofagia (ATG) que actúan en diferentes etapas, siendo algunas de las más importantes ULK1, ATG5, ATG7, el complejo PI3KIII (Beclin 1, VPS34, p150, ATG14) y LC3 (microtubule-associated light chain 3). La autofagia tiene un rol importante en la supervivencia celular al evitar la acumulación de proteínas de larga duración y organelas defectuosas. Puede así contraponerse a estímulos proapoptóticos, mientras que su disfunción está asociada a patologías metabólicas, neurodegenerativas y neoplásicas. La autofagia forma parte de las respuestas celulares que tienen lugar durante las infecciones bacterianas y virales, inclusive participando en la eliminación del patógeno y/o regulando la respuesta inmune innata o adquirida (Deretic et al., 2013). La autofagia “no selectiva” es una respuesta catabólica que ocurre en situaciones como la depleción de nutrientes, para proporcionar aminoácidos y otras materias primas necesarias para la supervivencia celular. En estos casos no hay eliminación de organelas o complejos moleculares particulares de la célula (Galluzzi et al., 2014). Por el contrario, la autofagia “selectiva” consiste en la eliminación de “blancos” específicos: peroxisomas (pexofagia), retículo endoplásmico (ER, erfagia), ribosomas (ribofagia), lípidos (lipofagia), microorganismos (xenofagia) y mitocondrias (mitofagia)(Klionsky et al., 2016b).

1.4 Mitofagia, una forma selectiva de autofagia

La mitofagia conforma un potente sistema de resistencia a la toxicidad por daño mitocondrial. El rol de mantener la integridad y función mitocondrial es importante para el bienestar celular (Stotland et al., 2015). En primer lugar, requiere identificar las mitocondrias disfuncionales que serán eliminadas mediante el proceso de autofagia. Esto ocurre de manera integrada con otros procesos como la creación de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial) y los reordenamientos morfológicos de la red mitocondrial (proceso de dinámica mitocondrial que comprende fusión y fisión de mitocondrias). Este sistema en su conjunto permite adaptar cantidad y calidad

mitocondrial a las condiciones microambientales y demandas fisiológicas (Fig. 1.4). La mitofagia ocurre en situaciones como la hipoxia, donde las mitocondrias se convierten en fuentes de ERO intracelular por alteraciones en la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Durante la respuesta adaptativa a la hipoxia la mitofagia elimina mitocondrias, a la vez que se estimula la producción de energía por medio de la glicólisis anaeróbica, pero si esta respuesta es insuficiente la propia red mitocondrial puede iniciar el proceso de muerte regulada (apoptosis intrínseca o mitocondrial (Wu *et al.*, 2015). Un ejemplo ilustrativo son las células cardíacas en situaciones de isquemia. La hipoxia es uno de los principales inductores de mitofagia mediada por BNIP3 (Ney, 2015). La mitofagia también participa en varios procesos fisiológicos como la eliminación de las mitocondrias paternas del óvulo fecundado, la hematopoyesis y la eritropoyesis. Su aumento conduce a reducciones en número y tamaño de las mitocondrias, como ocurre en las células madre quiescentes. La mitofagia es esencialmente una sucesión de transformaciones que culmina con la degradación lisosómica. Es entonces importante interpretarla como un flujo de mitocondrias en proceso de eliminación (flujo mitofágico), que está regulado en cada etapa por una gran variedad de mecanismos moleculares, desde la identificación de las mitocondrias a eliminar, hasta su remoción definitiva. La identificación inicial está relacionada con la dinámica mitocondrial, ya que las mitocondrias dañadas presentan bajo potencial y no pueden volver a fusionarse (Fig. 1.4).

1.4.1 La mitofagia como parte de un sistema de control de calidad mitocondrial

Las mitocondrias pasan por ciclos constantes de fusión y fisión en las que intervienen GTPasas de la superfamilia de las dinaminas (Labbe *et al.*, 2014). La fusión esta mediada por las GTPasas mitofusinas (Mfn) 1 y 2 ubicadas en la membrana externa mitocondrial (MEM) y otra dinamina denominada OPA1 en la membrana interna mitocondrial. La fisión está mediada por Drp1, una proteína citosólica que se localiza en la superficie mitocondrial durante la fisión. Las Mfn1y 2 ubiquitinizadas pueden eliminarse vía proteasoma, bloqueándose así la fusión y dando lugar a la fisión. La fisión genera mitocondrias más pequeñas que, si son disfuncionales no pueden volver a fusionarse entre sí. Estas mitocondrias fragmentadas se incorporan fácilmente a los autofagosomas por su pequeño tamaño (Hamasaki *et al.*, 2013). La fisión mitocondrial es indispensable para la mitofagia pero no suficiente, ya que además se deben activar mecanismos moleculares que detecten la falla mitocondrial e inicien la formación del mitofagosoma. Estos mecanismos incluyen el reclutamiento de proteínas como Pink1 y Parkin, que inician modificaciones moleculares sobre la MEM, para posteriormente permitir la interacción con complejos moleculares que comienzan el

ensamblado del mitofagosoma (Matsuda *et al.*, 2010). La falla mitocondrial puede originarse por múltiples causas, como mutaciones de proteínas mitocondriales o agentes con toxicidad directa sobre la mitocondria (arsénico, hierro y otros metales de transición, BH3-miméticos y otras drogas citotóxicas, pesticidas como la rotenona e inhibidores de la OXPHOS en general). Todas estas causas inducen aumento de ERO mitocondrial, con daño de los complejos respiratorios de la membrana interna y finalmente el colapso del potencial de membrana mitocondrial. Pink1 (kinasa de serina/treonina) se estabiliza en la MEM y recluta a Parkin, una E3 ligasa que ubiquitina decenas de proteínas de la MEM, incluyendo Mfn1 y Mfn2, y así bloquea la capacidad de fusión de las mitocondrias dañadas (Matsuda *et al.*, 2010). La ubiquitinización de proteínas de la MEM permite que la proteína p62/SQSTM1 pueda unirse a los residuos de ubiquitina y actuar como puente con LC3, una de las principales moléculas de la membrana de los autofagosomas. Parkin también puede inducir mitofagia a través de la interacción con Ambra1. En estadios tempranos de la enfermedad de Parkinson se han identificado mutaciones en los genes Pink1 y Parkin. El complejo Parkin-p62-LC3 no es la única forma de ensamblado de mitofagosomas, sino que otras moléculas como BNIP3 y Nix también se trasladan a la MEM y funcionan de puente al interactuar directamente con LC3. Por esta razón BNIP3 y Nix se denominan además receptores mitofágicos (Hanna *et al.*, 2012). Paradójicamente, BNIP3 también es una proteína proapoptótica del tipo “BH3-only” de la familia bcl2 (Gustafsson, 2011).

1.4.2 La biogénesis de nuevas mitocondrias completa el “turnover” mitocondrial

Existe un sistema de comunicación recíproca entre el núcleo y las mitocondrias. El flujo mitofágico produce una reducción de la masa mitocondrial junto a señales regulatorias de transcripción nuclear para el ensamblado de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial) (Jazwinski, 2013). PGC-1 α es el principal factor de transcripción nuclear y regulador maestro de la biogénesis, controlando la expresión de numerosas proteínas mitocondriales (Xu *et al.*, 2014). Así no sólo se eliminan las mitocondrias falladas, sino que se mantiene una masa mitocondrial acorde con la demanda energética de la célula. La coexistencia de mitofagia y biogénesis determina la tasa de recambio mitocondrial y es un efectivo sistema homeostático de control de calidad. La biogénesis y la etapa final de la mitofagia ocurren en la zona perinuclear de la célula, localización relacionada con la regulación recíproca núcleo-mitocondria. Desde allí las nuevas mitocondrias son transportadas a los puntos de mayor demanda energética por la red de microtúbulos. Mientras que en los linfocitos normales, la distribución mitocondrial es periférica (debido a la demanda energética de los

reordenamientos del citoesqueleto). en ciertos linfomas la red mitocondrial se acumula anormalmente alrededor del núcleo.

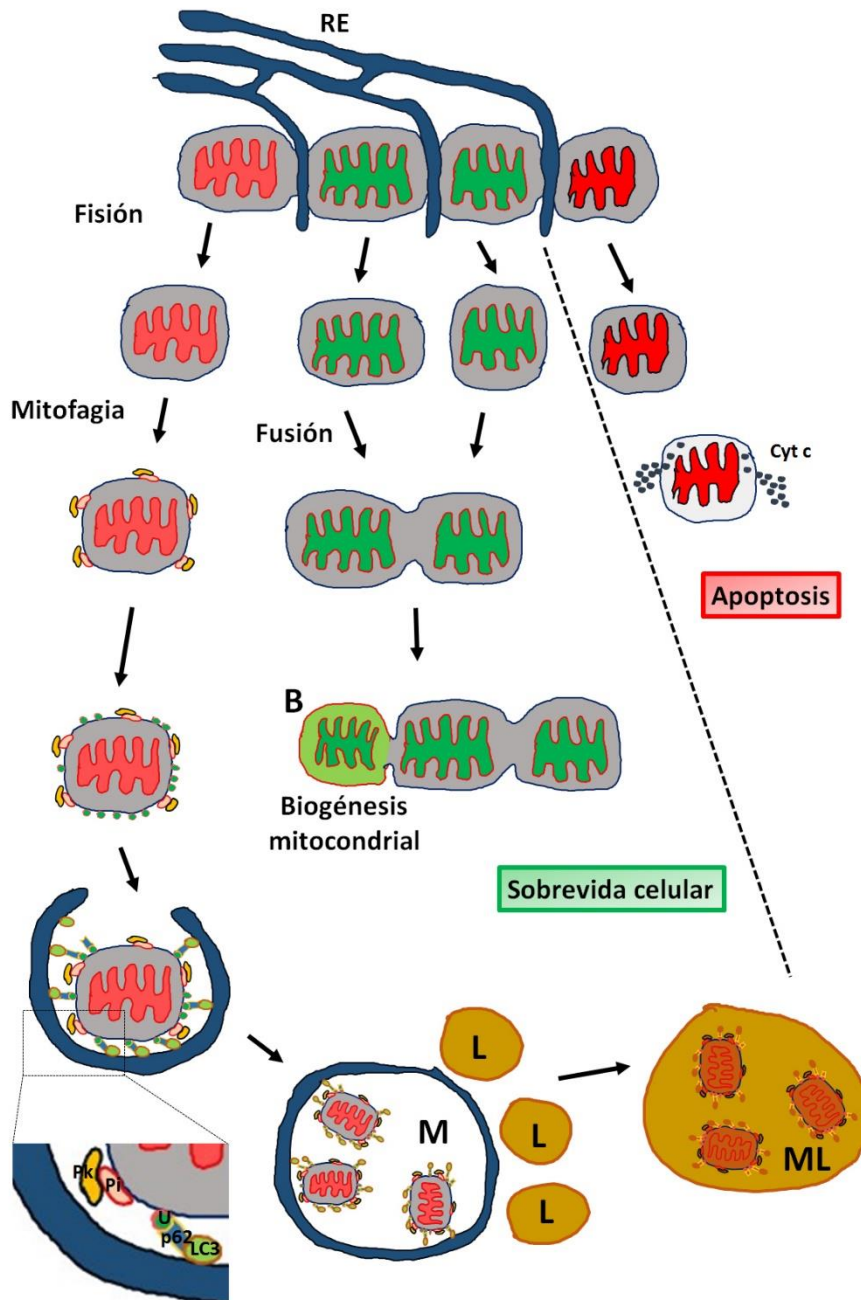


Figura 1.2 Mitofagia y su interacción con la dinámica y biogénesis mitocondrial. La fisión es el primer paso de un sistema de control de calidad mitocondrial. El retículo endoplásmico (RE) marca los sitios donde se ensamblan los complejos moleculares que dividen a las mitocondrias. El daño mitocondrial se refleja en

una caída del potencial de membrana. Las unidades con bajo potencial se muestran en rojo. Dependiendo de la extensión del daño, el balance puede inclinarse hacia la mitofagia y eliminación de las mitocondrias dañadas (izquierda) facilitando la supervivencia celular, o hacia la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MEM) con liberación de citocromo c (Cyt c) e inicio de la apoptosis intrínseca o mitocondrial (derecha). En el caso de la mitofagia la caída de potencial estabiliza Pink1 (Pi) y recluta Parkin (Pk) a la mitocondria. Parkin a su vez ubiquitina (U) masivamente las proteínas de la MEM, permitiendo que p62 establezca un puente con LC3 y se inicie la formación de la vesícula de doble membrana o mitofagosoma (M). El mitofagosoma finalmente se une a los lisosomas (L), para completar la degradación en un medio ácido, formando un mitofago-lisosoma (ML). Por el contrario, las mitocondrias con potencial de membrana normal pueden volver a fusionarse. La biogénesis mitocondrial compensa la eliminación por mitofagia creando nuevas unidades respiratorias (B) en un proceso coordinado entre núcleo y mitocondria (“turnover” mitocondrial).

1.5 La respuesta antioxidante en la homeostasis y supervivencia celular

La oxidación enzimática de moléculas y la utilización de oxígeno en la fosforilación oxidativa generan ERO. Estas moléculas son sumamente reactivas y pueden oxidar a su vez a componentes celulares afectando así su función, por esta razón las defensas que mantienen este daño contenido son de suma importancia para la célula. Estas defensas pueden clasificarse en no enzimáticas y enzimáticas. Las primeras se caracterizan por poseer diversas funciones principales. En primer lugar reaccionan con los radicales libres y los inactivan, como por ejemplo radicales lipoperoxil. En segundo lugar tienen la capacidad de alejar los radicales de los sitios más sensibles, llevándolos a sitios donde el daño sea menor, como por ejemplo desde la membrana al citosol (Sies, 1997). Entre los antioxidantes no enzimáticos más importantes se encuentran: el ácido ascórbico, el α tocoferol y el glutatión. El ácido ascórbico, conocido como vitamina C, puede reprimir radicales libres, pero por ser hidrosoluble lo hace en el plasma, líquido intersticial y fase acuosa de la célula. El α tocoferol, o vitamina E, actúa como un antioxidante de la membrana plasmática, y es capaz de detener las reacciones en cadena de los radicales libres. Esto es así ya que el tocoferol al atrapar un radical libre se convierte en radical tocoferoxil, el cual es muy poco reactivo. Por último se encuentra el glutatión (GSH) que debe su capacidad antioxidante al grupo tiol de su residuo cisteína. El grupo tiol facilita la alta capacidad antioxidativa del glutatión, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones de toxicidad xenobiótica (Meister *et al.*, 1983). El glutatión además ayuda en la regeneración de otros antioxidantes, por ejemplo la vitamina E y el ácido ascórbico (Valko *et al.*, 2007). Por otro lado, es un co-factor de la enzima glutatión peroxidasa y también está involucrado en la formación de aductos, ya sea por acción propia o por la de la enzima glutatión S-transferasa. La dupla GSH/GSSG

(glutatión disulfuro, la forma oxidada de GSH) es el sistema redox más abundante en las células eucariotas (Meister *et al.*, 1983) y cumple un rol fundamental en la homeostasis celular (Valko *et al.*, 2007) participando en procesos de señalización relacionadas a la inducción de apoptosis (Circu *et al.*, 2008; Filomeni *et al.*, 2002). La síntesis de GSH requiere dos enzimas ATP dependientes. La etapa limitante de velocidad es catalizada por la glutamato-cisteína ligasa, la cual convierte Glu y Cys en γ -GluCys, la cual es convertida en GSH por la glutatión sintetasa (Blair, 2006; Townsend *et al.*, 2008).

Dentro de los antioxidantes enzimáticos podemos destacar a la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque también cabe resaltar la tarea de reposición de GSH, donde la molécula GSSG es reducida por la enzima glutatión reductasa, y la de transporte y eliminación de compuestos reactivos por parte de la glutatión S-transferasa (Packer *et al.*, 2007; Sies, 1997).

La glutatión peroxidasa (GPx) pertenece a una familia de proteínas que poseen la capacidad de reducir hidroperóxidos a partir de tioles. La catálisis es mediada por un sitio activo que posee selenocisteína o cisteína. La primera en ser descubierta fue la Gpx1, la cual cataliza la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos utilizando glutatión. Esta se localiza en el citosol y en la matriz mitocondrial. Al regular la cantidad de peróxido, la glutatión peroxidasa puede modular respuestas inflamatorias y mecanismos de muerte celular (Battin *et al.*, 2009).

1.6 El estudio de las combinaciones de fármacos citotóxicos

1.6.1 El método del efecto medio y el índice de combinación (CI)

La complejidad del resultado de la interacción del TOA con otras drogas en cuanto a su efecto citotóxico, hace necesario el uso de métodos como el del índice de combinación de Chou-Talalay. Este método permite analizar el efecto de múltiples drogas combinadas, obteniendo un indicador que establece si existe sinergismo, aditividad o antagonismo, para cada nivel de efecto citotóxico (Chou, 2010; Chou *et al.*, 1984; Peng *et al.*, 2010). El análisis parte de la evaluación de la función dosis vs efecto citotóxico de los fármacos individuales. Luego se evalúa la función dosis vs efecto citotóxico usando una combinación de los fármacos en estudio. Esto permite tener una primera aproximación sobre la potencia citotóxica de ambas drogas en forma individual y aquella que resulta al combinarlas. La medida más importante de la potencia citotóxica, es la dosis citotóxica que produce la muerte en el 50% de las células (CE50). Para obtenerla se utiliza un procedimiento de regresión sobre datos experimentales, en el que se deben utilizar concentraciones crecientes en el

rango que producen efectos citotóxicos crecientes, hasta alcanzar valores cercanos al 100%. Este procedimiento se conoce como análisis o método de efecto medio. De manera ideal la función dosis vs efecto citotóxico debe construirse en base a la identificación de muerte en células individuales. Esto permite el uso de modelos probabilísticos (modelos cuánticos) en los que nada se asume acerca de los principios fisicoquímicos de la interacción droga-receptor (modelos determinísticos). Simplemente se debe evaluar la ocurrencia o no de muerte en cada célula analizada. En la combinación de dos fármacos citotóxicos **a** y **b**, uno tendrá menor potencia que otro, por lo cual, por ejemplo, CE50a será menor que CE50b, si **a** es el fármaco más potente. Al combinarlos la potencia de **a+b** será intermedia entre CE50a y CE50b. Si la potencia CE50a+b es exactamente intermedia, se dice que el efecto es aditivo y esto indica que el fármaco **b** es como una forma diluida del fármaco **a** en cuanto al efecto citotóxico. Si la potencia citotóxica de la combinación decrece y la CE50a+b se acerca a la potencia CE50b, se dice que la interacción es antagónica. En ese caso podemos suponer que se ha afectado el mecanismo inductor de muerte celular de los fármacos combinados, y/o las células han logrado mejorar su respuesta de supervivencia, frente a la noxa que representa el tratamiento citotóxico. En cambio, cuando la potencia de la combinación aumenta, y CE50a+b se acerca a la CE50a, se dice que ocurre sinergismo. Significa en este caso que ha mejorado la efectividad de los mecanismos citotóxicos de los fármacos combinados, y/o se han deteriorado las respuestas protectoras de las células. El índice de combinación hace una comparación de la potencia citotóxica de cada fármaco, cuando se aplica en forma individual y cuando se aplica combinado. Establece así una relación entre la potencia de cada fármaco cuando actúa sólo y la potencia cuando se encuentra combinado. Cuando el CI > 1 indica que la potencia relativa en la combinación decrece, mientras que cuando el CI < 1 indica que la potencia relativa citotóxica aumenta. Por último, cuando el CI=1, nos indica que la potencia de los fármacos cuando están combinados, es similar en términos relativos, a la potencia que tienen cuando se los usa de manera individual. Lo interesante del CI es que nos brinda esta información no solamente para el nivel de efecto 50%, sino para todo el rango de efectos. De esta manera brinda una importante información acerca del comportamiento biológico de las células, frente a las combinaciones de los fármacos citotóxicos. En el Anexo I se hace una descripción detallada del método y se da un fundamento para su aplicación e interpretación.

Así como el conocimiento de los mecanismos puede sugerir el tipo de interacción farmacológica más probable, el análisis de interacciones puede de manera recíproca orientar el estudio de los

mecanismos moleculares que determinan la sensibilidad y la resistencia a un determinado tratamiento (Cavaliere *et al.*, 2014; Lombardo *et al.*, 2012a; Lombardo *et al.*, 2012b).

1.6.2 ¿Cómo medir la influencia de las respuestas de stress en la muerte regulada? La CE50 como indicador del punto de equilibrio “Noxa vs respuesta celular de stress”

Claramente la intensidad de la noxa y la intensidad de las respuesta celulares de stress tienen un punto de equilibrio. En términos de fármacos citotóxicos, este punto de equilibrio se corresponde con la dosis citotóxica 50% (CE50). Es decir, la dosis en la cual los mecanismos de supervivencia dominan en el 50% de las células, y los mecanismos iniciadores de la muerte celular dominan en el 50% restante (Chou, 2010). Esto ilustra que cuanto mayor sea la dosis CE50 del fármaco citotóxico, mayor es la intensidad de las respuestas celulares de stress, capaces de oponerse al inicio de la muerte regulada (Fig. 1.3B). Esto es particularmente útil en estudios con fármacos que tienen como blanco respuestas de stress específicas, como el sistema ubiquitina-proteasoma, la mitofagia y la autofagia. En particular cuando se los combina con fármacos iniciadores de muerte celular, como por ejemplo los inductores de la llamada apoptosis intrínseca o mitocondrial. De esta forma es posible medir la competencia entre los mecanismos iniciadores de muerte celular y las respuestas de stress que se oponen (Fig. 1.3B). Es decir, aplicando un viejo dogma de la Toxicología a la muerte celular regulada, podemos afirmar que: “todo fármaco es citotóxico; sólo depende de la dosis”. La CE50 es la mínima dosis capaz de iniciar la muerte regulada venciendo a las respuestas de stress en el 50% de las células (Fig. 1.3B).

1.6.3 Adición de las células neoplásicas a las respuestas de stress celular, CE50 y selectividad farmacológica

Las células neoplásicas desarrollan verdaderas adicciones a ciertas respuestas de stress. Esto las hace vulnerables a la inhibición de estas respuestas. Un caso ilustrativo son las células de mieloma múltiple, las cuales tienen exacerbada la degradación asociada a retículo endoplasmico (ERAD) y por esta razón son vulnerables a la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma (Nikesitch *et al.*, 2016). Esto se traduce en una baja CE50 para los inhibidores de proteasoma (Bortezomib, Carfilzomib, MG132), siendo la causa de la selectividad de estos fármacos sobre las células de mieloma. Generalizando, una baja CE50 para Bortezomib es indicador de adicción a ERAD. Del mismo modo el valor de la CE50 de drogas inhibitoras de mitofagia o autofagia como la vincristina (VCR) pueden

demostrar el grado de influencia de esas respuestas de stress en la muerte regulada ([Senft et al., 2015](#)).

Objetivos

Objetivos generales

El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios que ocurren en la potencia citotóxica del trióxido de arsénico (TOA), un fármaco utilizado como monoterapia en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, al combinarse con el inhibidor de proteasoma MG132, en dos modelos de neoplasias hematológicas humanas, la línea celular U937 (leucemia promonocítica) y Raji (linfoma de Burkitt). En este trabajo proponemos evaluar además los mecanismos por los cuales se producen dichos cambios de potencia al combinar las dos drogas, incluyendo el rol de la expresión proteína BNIP3, la producción de anión superóxido, las defensas antioxidantes, la autofagia y el daño mitocondrial. De esta manera este trabajo propone evaluar en qué medida los cambios en estas variables pueden ayudar a lograr una mayor efectividad terapéutica, junto a una reducción de la dosis utilizada de cada compuesto, y contribuir así a disminuir la frecuencia y gravedad de los potenciales efectos adversos.

Objetivos específicos

1- Desarrollar un método de alto rendimiento para la evaluación masiva de muerte celular aplicable a la evaluación de potencia citotóxica de drogas utilizadas en forma individual y combinada (modelo probabilístico para la determinación de interacción)

2- Evaluar la potencia de TOA y el inhibidor de proteasoma MG132 como drogas individuales en la línea celular Raji (linfoma de Burkitt) y U937 (leucemia promonocítica)

3- Evaluar el efecto combinado de TOA y MG132 en células U937 y Raji e indagar sobre los factores que influyen sobre la potencia relativa de las drogas combinadas incluyendo los siguientes:

- Producción de anión superóxido
- Producción de GSH
- Daño mitocondrial
- Expresión y modulación de BNIP3
- Inducción de autofagia general
- Inducción de autofagia selectiva de mitocondrias

4- Evaluar si es posible modificar la potencia relativa de las drogas combinadas por medio de la modulación de los factores identificados como influyentes en la interacción, para de esa manera sensibilizar a las líneas celulares a los efectos del TOA y el MG132

5- Evaluar en qué medida la evaluación es aplicable a células de pacientes con neoplasias hematológicas, a fin de lograr sensibilizar a las células neoplásicas a los efectos del TOA y MG132

2 Materiales y Métodos

2.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares de origen humano, U937 (leucemia promonocítica (ECACC)) y Raji (linfoma de Burkitt (ATCC)) fueron cultivadas en suspensión en estufa con atmósfera humidificada y con 5% CO₂ a 37°C. Se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-Glutamina 2mM, Penicilina 100mg/ml y Estreptomicina 150 mg/ml. Para su mantención, las células de ambas líneas fueron repicadas al medio cada 2 o 3 días de manera de mantener una densidad de 0.5 a 1.5x10⁶ células/ml. En todos los casos, los experimentos se llevaron a cabo con una viabilidad superior al 95% al momento de la siembra (determinada por exclusión de azul tripán).

2.2 Obtención y procesamiento de células de pacientes

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción venosa, con EDTA como anticoagulante, previo consentimiento informando¹. Las células sanguíneas fueron sometidas a separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque para obtener células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Las muestras fueron cultivadas con los tratamientos correspondientes en RPMI-1640 con 10% de SFB en atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C. La viabilidad celular luego de la obtención de las CMSP se evaluó por tinción con azul tripán siendo en todos los casos superior al 95%.

2.3 Drogas y Reactivos

El TOA fue gentilmente provisto por Varifarma (Argentina), CAPE y MG-132 fueron obtenidos de Calbiochem (San Diego, California, Estados Unidos), la VCR fue gentilmente provista por el laboratorio farmacéutico Filaxis SA (Bs. As., Argentina), 5-azacitidina (Mielozitidina) fue gentilmente provista por Laboratorio LKM (Argentina) y el ácido valpróico (VPA) se obtuvo de Casasco Pharmaceuticals (Argentina). El medio de cultivo utilizado, RPMI-1640, los antibióticos penicilina y estreptomicina, las sondas fluoresceína diacetato (FDA), ioduro de propidio (IP), hidroetidina (HE),

¹ realizado por la Dra. Laura Kornbliht, Servicio de Hematología, Hospital de Clínicas, como parte del proyecto UBA-CM11 "Estudio de proliferación, apoptosis, expresión de BNIP3 y sensibilidad a los hipometilantes en células hematopoyéticas de pacientes con síndromes mielodisplásicos: evaluación del valor clínico pronóstico"

5-clorometil-fluoresceína (5-CMF), tetrametil-hidrorodamina-etil-ester (TMRE), naranja de nonil-acridina (NAO), Mito Tracker Red (MTKred) y DAPI, fueron adquiridos a Invitrogen (Bs. As., Argentina).

2.4 Tratamientos

Se prepararon soluciones frescas TOA 1mM y VPA 100mM antes de cada experimento. MG132 y CAPE se resuspendieron en DMSO a una concentración 5mM 350mM respectivamente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para VCR se prepararon soluciones stock 100µM en solución fisiológica que fueron almacenadas a -20°C por no más de 30 días. Al momento de realizar los tratamientos individuales o combinados, se prepararon en condiciones de esterilidad diluciones 2X de los tratamientos correspondientes en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB. Las mismas se adicionaron luego a igual volumen de suspensión celular en las placas de cultivo correspondientes. Posteriormente se realizó la incubación en estufa humidificada a 37°C y 5% CO₂ por el tiempo requerido en cada ensayo.

2.5 Determinación de muerte celular mediante citometría de flujo con Fluoresceína diacetato (FDA) y Ioduro de Propidio (IP)

Las células U937 o Raji se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/ml y se incubaron por triplicado con un rango de 6 dosis de los tratamientos individuales o combinados por 72hs a 37°C y 5% de CO₂. Como control de muerte basal se agregó RPMI 1640 con 10% SFB. Los experimentos se repitieron modificando los rangos e intervalos de concentraciones hasta encontrar un diseño que permitiera cubrir el rango citotóxico completo. Una vez hallado el esquema de tratamientos deseado se realizaron al menos tres experimentos independientes en cada caso. Para identificar la células vivas y muertas se realizó una doble marcación FDA/IP. Brevemente, luego de los tratamientos las células se incubaron por 15 min con FDA 1µM y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente se realizó la marcación con 1µg/ml de IP e inmediatamente se analizaron las muestras por citometría de flujo adquiriendo 20.000 eventos por muestra. La fluorescencia emitida por FDA y IP se colectó utilizando filtros bandpath de 535/15nm (verde) y 680/15 (rojo) respectivamente ([Lombardo et al., 2011](#)). El análisis por cuadrantes para obtener los porcentajes de muerte se llevó a cabo con el programa Flomax (Partec, Alemania).

2.6 Inhibición de la proliferación celular por incorporación de Timidina tritiada [³H]-TdR

Las células (2.5×10^5 /ml) fueron sembradas a placas de 96 pocillos y se expusieron por triplicado a las diferentes concentraciones de los tratamientos correspondientes (vf= 200 μ L/pocillo). Luego fueron cultivadas por 72hs a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ y pulsadas con 1 μ Ci de [³H]-TdR (DuPont, Nen Products, Boston, MA, Estados Unidos) 18hs antes de finalizar la incubación. Cumplidas las 72hs de tratamiento, las células fueron cosechadas según se describe en (Cerde Zolezzi *et al.*, 2005). La incorporación de [³H]-T en cada pocillo se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman, MD, USA) expresada en cuentas por minuto (cpm). La inhibición de la proliferación para cada tratamiento se calculó como fracción de efecto con valores entre 0 (ausencia de efecto inhibitorio) y 1 (efecto inhibitorio máximo) utilizando la fórmula: $1 - [\text{cpm tratamiento} / \text{cpm basal}]$. Los experimentos se repitieron modificando los rangos e intervalos de concentraciones hasta encontrar un diseño que permitiera cubrir el rango de efecto inhibitorio completo. Una vez hallado el esquema de tratamientos deseado se realizaron al menos tres experimentos independientes en cada caso.

2.7 Cálculo de ecuación de efecto medio y análisis de interacción de drogas

El procedimiento detallado de este análisis se describe de manera completa en el ANEXO I y ha sido publicado en trabajos previos (Lombardo *et al.*, 2012a; Lombardo *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2013). Brevemente, para cada tratamiento individual o combinado se calculó a partir de los porcentajes obtenidos mediante los ensayos de FDA-IP la fracción de células muertas o (fracción afectada, Fa) y la de células vivas (fracción no afectada, $Fn = (1 - Fa)$). Por regresión logística se obtuvieron la pendiente y ordenada al origen de la ecuación $\log(Fa/Fn) = m \cdot \log(D) - m \cdot \log(Dm)$, en donde Dm es la dosis media y D es la variable independiente. Modificando en forma algebraica esta fórmula se obtiene la siguiente ecuación:

$$D = Dm (Fa / (1 - Fa))^{1/m}$$

A partir de esta fórmula, se pudo estimar la dosis D necesaria para inducir citotoxicidad en una determinada fracción Fa .

Para cada nivel de efecto i se calcularon los valores de índice de combinación $CI(i)$ según la siguiente ecuación:

$$CI(i) = Dac(i) / Das(i) + Dbc(i) / Dbs(i) + \alpha Dac(i) \cdot Dbc(i) / Das(i) \cdot Dbs(i)$$

Donde $Dac(i)$ y $Dbc(i)$ son las dosis de las drogas a y b (respectivamente) requeridas para que la combinación a+b genere un nivel de efecto i .

$Das(i)$ y $Dbs(i)$ corresponden a las dosis de las drogas a y b requeridas para generar un nivel de efecto i al ser usadas como tratamiento individual. Al usar relaciones molares fijas de las drogas a y b en los ensayos combinados se asume una interacción mutuamente no excluyente en donde $\alpha=1$. La fórmula final entonces corresponde a:

$$CI(i) = Dac(i) / Das(i) + Dac(i) \cdot R / Dbs(i) + Dac(i) \cdot R \cdot Dac(i) / Das(i) Dbs(i)$$

Donde R es la relación molar entre las drogas del ensayo combinado.

Los cálculos se realizaron utilizando el programa Calculusyn (Biosoft, Reino Unido) el cual utiliza las formulas descritas más arriba. En paralelo, se utilizaron planillas de cálculo Excel para corroborar los resultados obtenidos, realizar el análisis de regresión y la generación de los gráficos correspondientes.

2.8 Determinación de la producción de O_2^- por citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/pocillo) y se las expuso a los tratamientos correspondientes durante 6 y 24hs. Cumplida la incubación se lavaron con PBS y se incubaron durante 20min con hidroetidina (HE, $\lambda_{ex}=510$ nm; $\lambda_{em}=590$ nm) $2\mu M$ a $37^\circ C$. Esta molécula, es capaz de ser oxidada a etidio por el O_2^- presente en la célula aumentando así su fluorescencia (Carter *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2009). Posteriormente las células se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo PAS III (Partec, Görlitz, Alemania) adquiriéndose 20.000 eventos por tubo. Como control positivo se utilizó el tratamiento con carbonil-cianuro-m-clorofenil-hidrazona (CCCP) $0,3\mu M$ (Sigma-Aldrich) 15 min antes del agregado de HE, esta sustancia actúa como desacoplante de la fosforilación oxidativa (Lombardo *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2013). La fluorescencia basal de las células sin tratar fue utilizada como referencia para comparar cambios en la producción de O_2^- inducidos por los tratamientos individuales y combinados (Izeradjene *et al.*, 2005). El análisis de los resultados obtenidos se realizó utilizando el programa WinMDI 2.9 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, Estados Unidos) utilizando la región de los gráficos FSC vs SSC correspondiente a células viables. Además, los datos obtenidos originalmente se exportaron al

programa Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, Estados Unidos) para la generación de diagramas de tipo Box-Whisker y posterior análisis estadístico.

2.9 Determinación del contenido de Glutati3n reducido (GSH) por citometría de flujo.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/pocillo) y se las expuso a los tratamientos correspondientes durante 6 y 24hs. Cumplida la incubación se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 20min con 5-CMF 300nM ($\lambda_{ex}=492$ nm; $\lambda_{em}=517$ nm) a 37°C (Lombardo *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2013). Esta sonda, al ingresar a la célula forma aductos fluorescentes por unión covalente a tioles no proteicos, de los cuales más del 95% corresponde a aductos 5-CMF-GSH (Hedley *et al.*, 1994; Markovic *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2009). Posteriormente las células se lavaron y se incubaron con $1\mu\text{g/ml}$ de IP por 5min para identificar las células no viables y finalmente se analizaron por citometría de flujo adquiriéndose 20.000 eventos por tubo. Como control positivo se utilizó el tratamiento con H_2O_2 0,5mM. La fluorescencia basal de las células sin tratar fue utilizada como referencia para comparar cambios en los niveles de GSH inducidos por los tratamientos individuales y combinados. El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo de la misma manera que se describe para los ensayos con HE.

2.9.1 Determinación del estado del PMM por citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/pocillo) y se las expuso a los tratamientos correspondientes durante 24hs. Cumplida la incubación se marcaron durante 20 min con Tetrametil-rodamina-etil-ester (TMRE) 100nM ($\lambda_{ex}=540$ nm; $\lambda_{em}=595$ nm) a 37°C . Esta sonda potenciométrica consiste en un colorante catiónico, liposoluble, que tiene la propiedad de acumularse preferentemente en la mitocondria cuando el PMM se encuentra inalterado emitiendo así fluorescencia rojo-naranja (Lombardo *et al.*, 2013). Una disrupción en el PMM hace que la sonda difunda al espacio extracelular con la consecuente disminución de la fluorescencia dentro de la célula. Luego de la incubación, las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron con DAPI $1\mu\text{g/ml}$ por 5min para identificar las células no viables (Cavaliere *et al.*, 2014; Cavaliere *et al.*, 2010). Finalmente se analizaron por citometría de flujo adquiriéndose 20.000 eventos por tubo. Como control positivo se utilizó el tratamiento con CCCP $0,3\mu\text{M}$ durante 10 min previos al agregado de TMRE. La fluorescencia basal de las células sin tratar fue utilizada como referencia para comparar

cambios en el PMM inducidos por los tratamientos individuales y combinados. El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo de la misma manera que se describe para los ensayos con HE.

2.10 Detección de cambios en la masa mitocondrial (MM) por citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/pocillo) y se las expuso a los tratamientos correspondientes durante 24hs. Cumplida la incubación se marcaron durante 30 min con naranja de nonil-acridina (NAO, ($\lambda_{ex}=495$ nm; $\lambda_{em}=519$ nm) 50nM a 37°C (Cavaliere *et al.*, 2014). Esta molécula fluorescente se une a cardiolipina marcando las mitocondrias de manera específica e independientemente del estado del PMM (Li *et al.*, 2015). Luego de la incubación, las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron con IP $1 \mu\text{g/ml}$ por 5min para identificar las células no viables y finalmente se analizaron por citometría de flujo adquiriéndose 20.000 eventos por tubo. La fluorescencia basal de las células sin tratar fue utilizada como referencia para comparar cambios en la MM inducidos por los tratamientos individuales y combinados. El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo de la misma manera que se describe para los ensayos con HE.

2.11 Determinación simultánea del contenido de autofagosomas y muerte celular mediante citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/ml y se incubaron por triplicado con los tratamientos individuales o combinados por 24h o 72hs según el caso a 37°C y 5% de CO₂. Para la determinación simultánea de contenido de autofagosomas y muerte celular se realizó una triple marcación FDA/IP/MDC. Brevemente, luego de los tratamientos las células se incubaron por 15 min con FDA $1 \mu\text{M}$ y 10 min con MDC $50 \mu\text{M}$ (ver también sección 2.17), luego de la incubación se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente se realizó la marcación con $1 \mu\text{g/ml}$ de IP e inmediatamente se analizaron las muestras por citometría de flujo adquiriendo 20.000 eventos por muestra. Como líneas de iluminación se utilizaron el láser de Argón 488 de 20W para la excitación de FDA y IP, y una lámpara UV de 365nm (100W) para la excitación de MDC. La fluorescencia emitida por MDC, FDA y IP se colectó utilizando filtros bandpath de 480/15nm (azul), 535/15nm (verde) y 680/15 (rojo) respectivamente. El análisis por cuadrantes se llevó a cabo con el programa Flomax (Partec, Alemania).

2.12 Detección de ARNm de BNIP3 mediante RT-PCR

El ARNm total de las muestras tratadas y en condición basal (5×10^6 células) se extrajo utilizando TRIZOL (Invitrogen, Argentina) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente se llevó a cabo la retro-transcripción según se describe en (Cavaliere *et al.*, 2014). Los ADNc así obtenidos se almacenaron a -70°C hasta su uso. Los controles negativos de la transcripción reversa fueron: a) Muestra de ARN total sometida a RT en ausencia de enzima para excluir la contaminación con ADN genómico; b) RT sin el agregado de muestras de ARN para el control de contaminaciones durante el experimento. Los controles positivos se basaron en la inclusión de muestras de ARN positivas conocidas.

Posteriormente, los ADNc se amplificaron usando los correspondientes cebadores/iniciadores para BNIP3 (sentido: 5'-CCACCTCGCTCGCAGACACCAC-3' y anti-sentido 5'GAGAGCAGCAGAGATGGAAGGAAAAC-3') (Murai *et al.*, 2005a). Se amplificó un fragmento de 317pb mediante el siguiente perfil térmico de 35 ciclos totales: desnaturalización 1min a 94°C , extensión a 72°C , annealing a 66°C (3 ciclos), 64°C (4 ciclos), 62°C (5 ciclos), 60°C (23 ciclos). Para evaluar la expresión relativa del gen de BNIP3, también se amplificó el gen de β -actina utilizando los iniciadores sentido 5'-ATGGATGACGATATCGCT-3' and anti-sentido 5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3' (tamaño del producto: 570pb) en un esquema de 25 ciclos (60s a 94°C , 60s a 52°C y 60s at 72°C) seguidos por una extensión de 10min a 72°C . Para asegurar que la amplificación ocurra dentro del rango exponencial y sin alcanzar el plateau que indica saturación se realizaron diluciones seriadas de cada ADNc. El ADN amplificado de cada PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (2,5% para BNIP3 y 1,5% para β -actina) en presencia de GelRed TM (Biotium-Hayward, Estados Unidos). Junto con las muestras se corrió un marcador de peso molecular (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos). Los geles fueron visualizados a través de un trans-iluminador UV (Cole Palmer Instrumental). Las imágenes de los geles se obtuvieron utilizando una cámara digital (Olympus, Camedia, D-150) y se sometieron a análisis densitométrico con el programa Image Scion. (Scion Corporation, Frederick, USA) La abundancia relativa BNIP3 se calculó relacionando los valores densitométricos obtenidos para los productos de BNIP3 con los de β -actina.

2.13 Detección de proteínas por Western Blot

2.13.1 Preparación de extractos proteicos

Luego de la exposición a los tratamientos correspondientes, se realizó un lavado con PBS y se incubaron 2×10^7 células de cada muestra con 400 μ L de solución hipotónica de lisis (Tris 20mM pH 8.0, NaCl 150mM, NaF 100mM, Glicerol 10%, Nonidet P-40 1%, PMSF 1mM, Leupeptina 40 μ g/ml y Aprotinina 20 μ g/ml) por 30 min a 4°C. Posteriormente se realizó una centrifugación a 12.000rpm durante 30 minutos luego de la cual se guardaron los sobrenadantes a -70°C hasta su uso (Cavaliere *et al.*, 2014).

2.13.2 Preparación de muestras, electroforesis y transferencia

La concentración total de proteínas se obtuvo mediante el método de Bradford y se procedió a preparar las muestras para la siembra en el gel. Para esto se colocó igual cantidad de proteína en cada caso (50 μ g para LC3, β -actina y 60 μ g para BNIP3) en buffer muestra (SDS 2%, Glicerol 10%, Tris 25mM pH 6.8, Urea 4M, 2-mercaptoetanol 1%) en relación de volúmenes 5:1 y se incubaron 5 min a 100°C. Posteriormente se sembraron las muestras en geles discontinuos de poliacrilamida (10% β -actina, 12% BNIP3 y 15% LC3) y se realizó la separación electroforética en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Cavaliere *et al.*, 2014). La corrida electroforética de las muestras se realizó a 100V - 60mA durante 20 minutos hasta que se logró el apilamiento total y luego se corrieron por 1 hora más a 180V hasta comprobar la caída del frente de corrida. Luego de la separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (GE Healthcare, Argentina) a 150mA durante 1h. La membrana conteniendo las proteínas ya transferidas se bloqueó con una solución de PBS-leche descremada (Molico) 3% y Glicina 2% durante toda la noche a 4°C.

2.13.3 Revelado de proteínas específicas

Luego del bloqueo, se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS-Tween20 0,05% y se incubó con la dilución correspondiente de anticuerpo primario, BNIP3 1:400 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), LC3 1:800 (Cell Signaling Technologies, Estados Unidos) o β -actina 1:700 (Santa Cruz Biotechnology, CA, Estados Unidos) durante toda la noche a 4°C. Luego de la incubación se realizó un lavado de 10 minutos y tres de 5 minutos con PBS-Tween20 0,05% para seguidamente incubar la membrana con un conjugado policlonal anti conejo marcado con peroxidasa (HRP) 1:8000 (Santa Cruz Biotechnology, CA), anti cabra marcado con HRP 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, CA) o bien anti-ratón marcado con HRP 1:8000 durante 1,5hs a 37°C (Cavaliere *et al.*, 2014). Luego de los lavados

correspondientes se realizó la inmunodetección por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (Santa Cruz Biotechnology, CA, Estados Unidos) según el procedimiento indicado por el fabricante. Las bandas obtenidas fueron fotografiadas y el análisis densitométrico de las mismas se realizó utilizando el software Image Scion (Scion Corporation, Frederick, Estados Unidos).

2.14 Microscopía de Fluorescencia

Con el fin de identificar los eventos moleculares y subcelulares responsables de la resistencia quimioterápica se desarrollaron diferentes estrategias experimentales de análisis mediante técnicas de microscopía de fluorescencia. En todos los casos los preparados se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-51 equipado con una lámpara de mercurio de 100W, una lámpara halógena para luz transmitida, objetivos de Fluorita U-plan y tres cubos de filtro de fluorescencia (U-MWU2, U-MWB2 y U-MWG2 para excitación con luz UV, azul y verde respectivamente). Todas las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital Olympus de Q-Color 3 y el programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos). El procesamiento de imágenes se realizó también con Image-Pro Plus 6.0. La fluorescencia de DAPI y MDC se evaluó a longitud de onda de excitación de 330-385 nm (filtro de U-MWU2). La fluorescencia FITC se evaluó a longitud de onda de excitación de 450-480 nm (filtro de U-MWB2). La fluorescencia de Mitro Tracker Red (MTKred) y RFP-LC3 fue evaluada en longitud de onda de excitación de 510-550 nm (filtro de U-MWG2).

2.15 Detección de la expresión de BNIP3 por Inmunofluorescencia

Las células en condición basal o tratadas según el caso, fueron fijadas en formaldehído al 4% en PBS por 30 min a 4°C. Para realizar el *quenching* de la autofluorescencia las células fueron lavadas luego de la fijación y resuspendidas en una solución PBS-Cloruro de amonio 25mM. Se realizó un nuevo lavado y se montaron las muestras en portaobjetos dejándolas secar a TA. Luego se realizó la permeabilización con metanol a -20°C por 10 min, un lavado con PBS y se las incubó por 1h a 3°C con solución de bloqueo (suero normal de conejo 2%, sero-albumina bovina (BSA) 1%, TritonX-100 0,3% en PBS). Luego del paso de bloqueo, los preparados fueron lavados e incubados toda la noche a 4°C con un anticuerpo murino anti-BNIP3 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) en una dilución 1/200 en buffer anticuerpo (2% BSA en PBS). Luego se lavaron los preparados y se incubaron con un anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma, MO, Estados Unidos) por 1h a TA. Finalmente se realizó un último lavado y se marcaron las muestras con DAPI 1µg/ml antes de la observación al microscopio. Se tomaron al menos 50 imágenes de distintos campos de

cada preparado a un aumento de 1000X utilizando el mismo tiempo de exposición para todas las muestras.

2.16 Estudio de la distribución mitocondrial y cálculo del área mitocondrial relativa (AMR)

Las células en condición basal o tratadas según el caso se marcaron con Mito Tracker Red CMXRos (MTKred) 50nM ($\lambda_{ex}=579\text{nm}$; $\lambda_{em}=599\text{nm}$) durante 20 min a 37°C en PBS. Esta molécula es oxidada una vez que ingresa a la célula aumentando así su fluorescencia y se acumula de manera específica en las mitocondrias siendo retenida incluso luego de la fijación con aldehídos. Luego de la incubación con la sonda, se realizó un lavado con PBS y se procedió al montaje en portaobjetos para la posterior observación por microscopía de fluorescencia. Se obtuvieron al menos 60 imágenes de fluorescencia roja y contraste de fase del mismo campo para cada preparado a una magnificación de 1000X. Para calcular el AMR, el contorno de las imágenes de fluorescencia roja de cada célula se rodeó con una línea utilizando la herramienta de segmentación automática del programa Image-Pro Plus 6.0. Se controló por observación directa que el demarcado fuera el correcto para cada célula analizada. El área total de cada célula analizada se obtuvo a partir de la imagen de contraste de fase del mismo campo. Este análisis se llevó a cabo en células tratadas por 24hs con las CE50 a 72hs de los tratamientos individuales o combinados (a este tiempo no se observaron grandes cambios en la viabilidad y morfología celular). Las medidas de área de fluorescencia roja correspondiente a mitocondrias y área total se exportaron a hojas de cálculo en donde se determinó el AMR para cada célula como: Área de MTKred/Área total, el cual se utilizó como indicador de distribución mitocondrial (Cavaliere *et al.*, 2014).

2.17 Detección de autofagosomas por Microscopía de fluorescencia

Para la detección de autofagosomas se utilizó mono-dancyl-cadaverina (MDC). Esta sonda lipofílica tiene la propiedad de incorporarse a los autofagosomas tempranos y maduros, en tanto que su acumulación produce una emisión de fluorescencia en el rango azul-verde, cuando se excita con luz UV ($\lambda_{ex}=338\text{nm}$; $\lambda_{em}=500\text{nm}$) (Klionsky *et al.*, 2016a; Munafo *et al.*, 2001; Vazquez *et al.*, 2009). Como toda sonda fluorescente lipofílica, el exceso de concentración puede marcar otras estructuras de manera inespecífica (Cavaliere *et al.*, 2010). Es por ello que mediante la realización de ensayos preliminares se optimizó la marcación de MDC para el trabajo con las líneas Raji y U937. Para ello se ensayaron concentraciones en un rango que comprendido entre 10 y 100 μM y tiempos de

incubación de entre 5 y 30 min. Finalmente se definieron una concentración de 50 μ M y un tiempo de 10min de incubación a 37°C como condiciones ideales y se utilizaron para todos los ensayos en los que se requirió la detección de autofagosomas.

2.18 Transfección con pRFP-LC3 y análisis de colocalización con MDC

Las células Raji (1×10^5) se transfectaron con pRFP-LC3 (Fader *et al.*, 2006) utilizando el DMRIE-C (Invitrogen, Argentina) según lo indicado por el fabricante, obteniéndose una eficiencia de transfección promedio del 25-30%. Las células transfectadas se incubaron por 48hs en RPMI-1640 suplementado con 10% SFB sin antibiótico en placas de 12 pocillos, luego se reemplazó el medio por RPMI-1640-10% SFB con antibiótico. Posteriormente, se trataron las células con VPA 3mM y VPA 3mM+VCR 1 μ M por 24hs y luego se marcaron con MDC (según se indica anteriormente), se lavaron una vez con PBS y se montaron en portaobjetos procediéndose luego a la observación en el microscopio de fluorescencia. Como controles se utilizaron células no transfectadas marcadas con MDC (control MDC) y células transfectadas sin marcar con MDC (control RFP). La excitación del control MDC con el filtro U-MWU2 de 330-385nm no mostró fluorescencia en el canal rojo de fluorescencia y la excitación del control RFP con el mismo filtro no mostró señal fluorescente en el canal azul. De esta manera se descartó la presencia de superposición espectral entre los fluoróforos. El análisis de colocalización se llevó a cabo utilizando Image-Pro Plus 6.0. Las imágenes de fluorescencia azul y roja se procesaron utilizando pseudocolores verde y rojo respectivamente para generar las imágenes superpuestas. El análisis de correlación verde vs rojo y los gráficos correspondientes de las regiones de las muestras biológicamente relevantes se llevó a cabo utilizando Image-Pro Plus 6.0.

2.19 Doble marcación MDC-Naranja de Acridina (NA) y análisis de colocalización

Para la observación conjunta de autofagosomas y lisosomas por microscopía de fluorescencia, las células Raji se marcaron durante 10min con MDC 50 μ M a 37°C. Luego de un lavado con PBS se adicionó NA 0.5 μ M e inmediatamente se procedió al montaje y observación de las muestras (Cavaliere *et al.*, 2014). Se realizaron los correspondientes controles de marcación simple para descartar la presencia de superposición espectral entre las dos sondas. El análisis de colocalización se llevó a cabo de la misma manera que se indica en el apartado anterior.

2.20 Doble marcación MDC-MTKred y análisis de colocalización

Para la observación conjunta de mitocondrias y autofagosomas por microscopía de fluorescencia, las células se marcaron con MTKred según se describió anteriormente y luego de un lavado con PBS se fijaron con formaldehído 4% en PBS por 30 min a 4°C. Posteriormente se lavaron las células y se procedió al montaje y observación de las muestras (Cavaliere *et al.*, 2014). Se realizaron los correspondientes controles de marcación simple para descartar la presencia de superposición espectral entre las dos sondas. El análisis de colocalización se llevó a cabo de la misma manera que se indica más arriba.

2.21 Doble marcación anti-BNIP3-MTKred y análisis de colocalización

Para la observación conjunta de mitocondrias y BNIP3 por microscopía de fluorescencia, las células U937 y Raji se marcaron con MTKred según se describió anteriormente y luego de un lavado con PBS se incubaron 10min con MDC 50µM a 37°C. La permeabilización y marcación con anticuerpo anti-BNIP3 y conjugado-FITC se realizó según se describe en la sección correspondiente. El análisis de colocalización se llevó a cabo de la misma manera que se indica más arriba.

2.22 Análisis estadístico

Los análisis de comparación múltiple se llevaron a cabo utilizando el análisis de la varianza de una sola cola (ANOVA de un factor) seguido del post test de Tukey-Kramer o bien un test de Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn para determinar diferencias entre las medias o medianas (respectivamente) según el caso (Lombardo *et al.*, 2011). Las diferencias entre los grupos tratado versus no tratado se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor a 0,05. Para la generación de gráficos tipo Box-Whisker se exportaron los datos originales de las citometrías al software Graph-Prism 4.0. Este mismo programa se utilizó para crear los gráficos de frecuencia acumulativa a partir de los datos de AMR obtenidos con Image-Pro Plus 6.0 en los ensayos de distribución mitocondrial.

3 Resultados

3.1 Efecto citotóxico de TOA y las combinatorias sobre la líneas U937 y Raji

3.1.1 Determinación de viabilidad “célula por célula” mediante citometría de flujo

La marcación de una muestra con FDA/IP y su evaluación por citometría de flujo, es una técnica que permite analizar la viabilidad celular a nivel individual en un gran número de células por tratamiento. Además, para clasificar un determinado evento como viable o no viable mediante este método, se tienen en cuenta dos variables: la actividad metabólica y la permeabilidad de membrana de cada célula en particular. Al realizar los experimentos, las células vivas mostraron alta fluorescencia para FDA y fueron negativas para IP. Por el contrario, las células muertas mostraron alta fluorescencia para IP debido a la pérdida de permeabilidad de membrana, mientras que exhibieron baja o nula fluorescencia para FDA, debido a la ausencia de actividad metabólica (Fig. 3.1). Al exponer las células a los tratamientos, se observó que aquellas que aun eran negativas para IP mostraban una disminución continua de la intensidad de fluorescencia para FDA mientras que el pasaje de IP negativo a IP positivo se da de manera abrupta. Este tipo de análisis provee una idea del camino que recorren las células al pasar de vivas a muertas luego de ser expuestas a agentes citotóxicos (Fig. 3.1C, flecha). Esta transición continua de vivas a muertas también pudo observarse en los gráficos de dispersión de fluorescencia (FSC vs. SSC), en donde las células al perder la viabilidad pasan de mostrar un alto FSC y bajo SSC (mayor tamaño y menor complejidad celular) a bajo FSC y alto SSC (Fig. 3.1B, flecha). Las células que se encuentran atravesando el programa de muerte se observan como IP negativas (permeabilidad de membrana intacta) pero con baja fluorescencia para FDA (baja actividad metabólica) y se ubican en un punto intermedio de este camino de muerte (Fig. 3.1C y 1D). Si interpretamos los diagramas de FDA vs IP como un gráfico de probabilidades según el número de eventos presentes en cada sector, veremos que la probabilidad de encontrar un evento en cada cuadrante del gráfico, depende de la magnitud del efecto citotóxico generado por un tratamiento a una dosis dada. Es decir, cuanto mayor es el efecto citotóxico ejercido por el tratamiento, mayor será la probabilidad de hallar células FDA negativas/IP positivas (Fig. 3.1, cuadrantes Q1) y menor la de encontrar FDA positivas/IP negativas (Fig. 3.1, cuadrantes Q4).

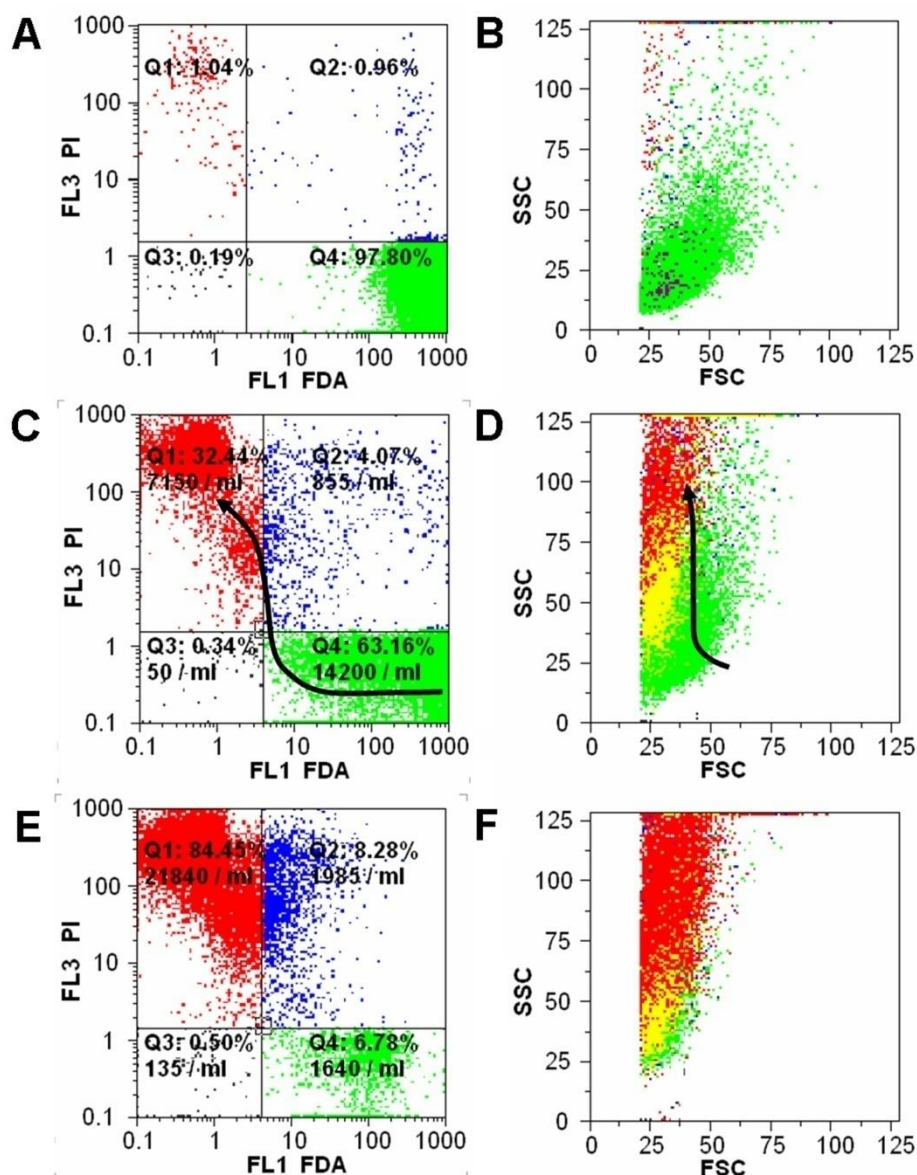


Figura 3.1. Determinación de viabilidad por citometría de flujo mediante marcación con FDA-IP. (A) Células U937 sin tratamiento con predominancia de células vivas, que muestran alta fluorescencia para FDA (verde) y nula para IP (rojo), indicando alta actividad metabólica e integridad de membrana conservada. (B) La población que aparece en verde muestra las propiedades de dispersión de luz frontal (FSC) y lateral (SSC) de las células mostradas en A. (C) Células U937 tratadas por 72hs con TOA 5 μ M, se observa una disminución en el porcentaje de células FDA positivas (vivas). Las células muertas se observan como FDA negativas y con alta fluorescencia para IP (rojo). Se observa además que parte de la población FDA positiva sufre una disminución en la intensidad de fluorescencia. La flecha muestra el camino que siguen los cambios en la fluorescencia al pasar las células de vivas a muertas (camino de muerte). (D) El área verde muestra las propiedades de dispersión de luz exclusivas de las células vivas, el área roja las de las células muertas, mientras que el área amarilla muestra las propiedades de dispersión compartidas por ambos estados. Unos pocos puntos azules evidencian que solo una minoría de las células presenta ambas marcas. La flecha muestra los cambios en los patrones de dispersión de luz al pasar de vivas a muertas.

(E) Muestra tratada con TOA 10 μ M por 72hs en donde se observa predominio de células IP positivas (muertas). (F) Propiedades de dispersión de luz de la muestra que se observa en E.

3.1.2 Efecto citotóxico de las drogas individuales sobre las líneas celulares

A partir de la distribución de eventos en cada cuadrante de los gráficos de FDA vs IP, nos fue posible calcular el porcentaje de muerte inducido por los tratamientos en un amplio rango de dosis. Luego, mediante regresión logística de los datos obtenidos experimentalmente, se obtuvieron las dosis de efecto citotóxico medio (Dm) de TOA, MG132 y CAPE a 72hs de tratamiento en las células U937 y Raji, utilizando un modelo cuantil de dosis respuesta (Casarett *et al.*, 2008; Tallarida, 2001). Posteriormente, se construyeron las curvas de predicción de efecto en todo el rango de efecto citotóxico (Figs. 3.2 y 3.3). A partir de este punto nos referiremos al valor medio (Dm) obtenido como concentración efectiva 50 (CE50). La CE50 de TOA en la línea U937 que se calculó a partir del gráfico de efecto medio fue de 7.37 μ M (Fig. 3.2A, D). La CE80 calculada a partir de la curva dosis respuesta fue superior a 18 μ M. En Raji se obtuvo una CE50 de 10.0 μ M mientras que la CE80 calculada fue superior a 30 μ M (Fig. 3.3A, D). Las altas dosis necesarias para ejercer citotoxicidad sobre las líneas U937 y Raji fueron concordantes con su ya descrita característica de resistencia al arsénico (Jing *et al.*, 1999). La CE50 de MG132 fue de 2.1 μ M en U937 con una CE80 calculada inferior a 4 μ M (Fig. 3.2B, E). En Raji la CE50 fue 0.7 μ M con una CE80 por debajo de 1.2 μ M (Fig. 3.3B, E). La CE50 de CAPE en U937 fue de 247 μ M con una CE80 superior a 275 μ M (Fig. 3.2C, F). En la línea celular Raji, la CE50 de CAPE fue de 197 μ M, mientras que la CE80 obtenida fue mayor a 236 μ M (Fig. 3.3C, F). Los resultados obtenidos para los tratamientos individuales en ambas líneas se encuentran resumidos en la Tabla 3.1.

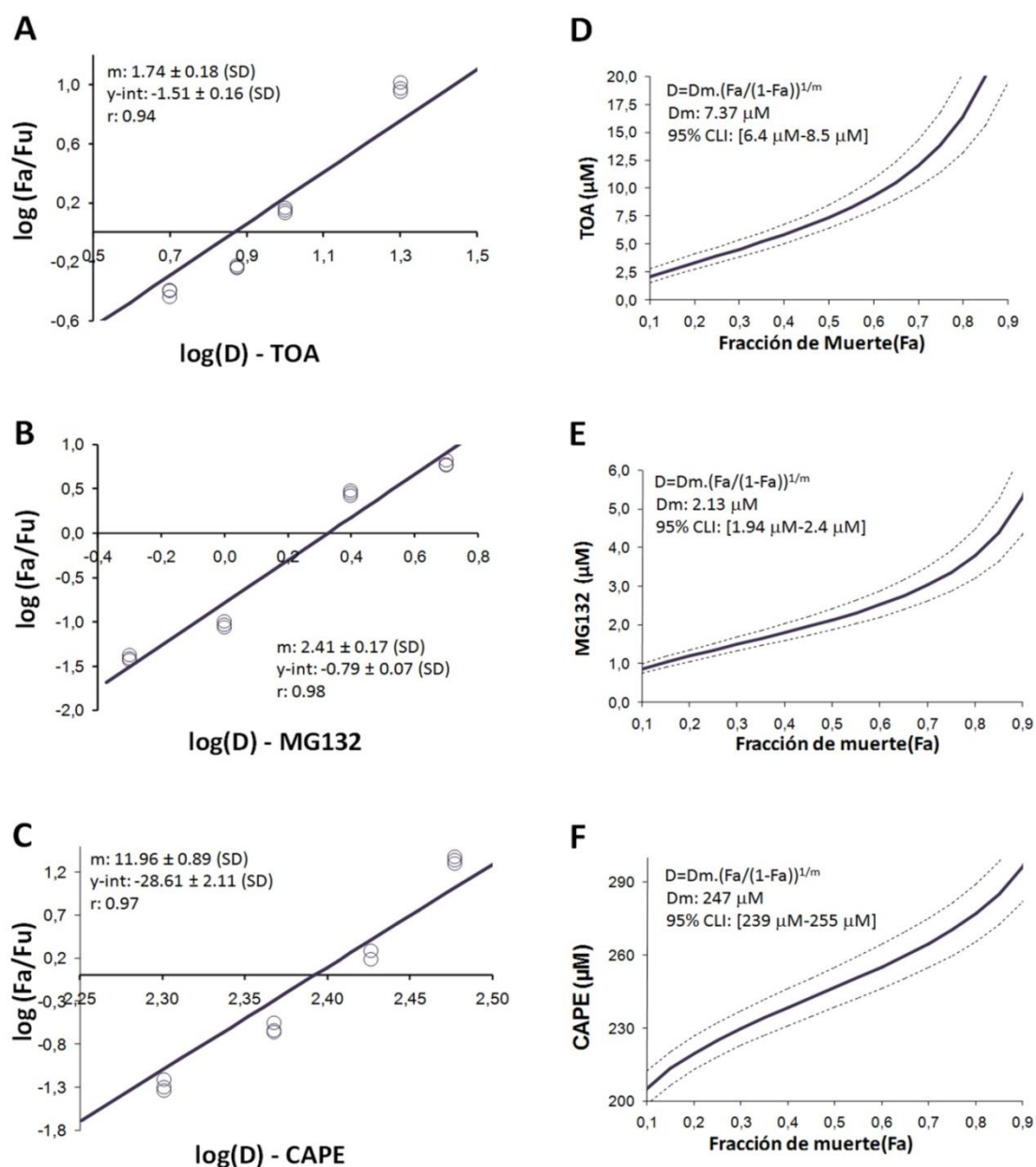


Figura 3.2. Cálculo del efecto citotóxico medio y curvas de predicción de efecto para las drogas individuales en la línea U937. Se muestran los resultados experimentales por triplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media (Dm) de efecto citotóxico para las tres drogas individuales en la línea U937 (A, B y C). A partir de estos datos se calcularon las curvas de predicción de efecto (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (líneas punteadas) (D, E y F). m = pendiente de la recta de regresión, $y\text{-int}$ = valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación.

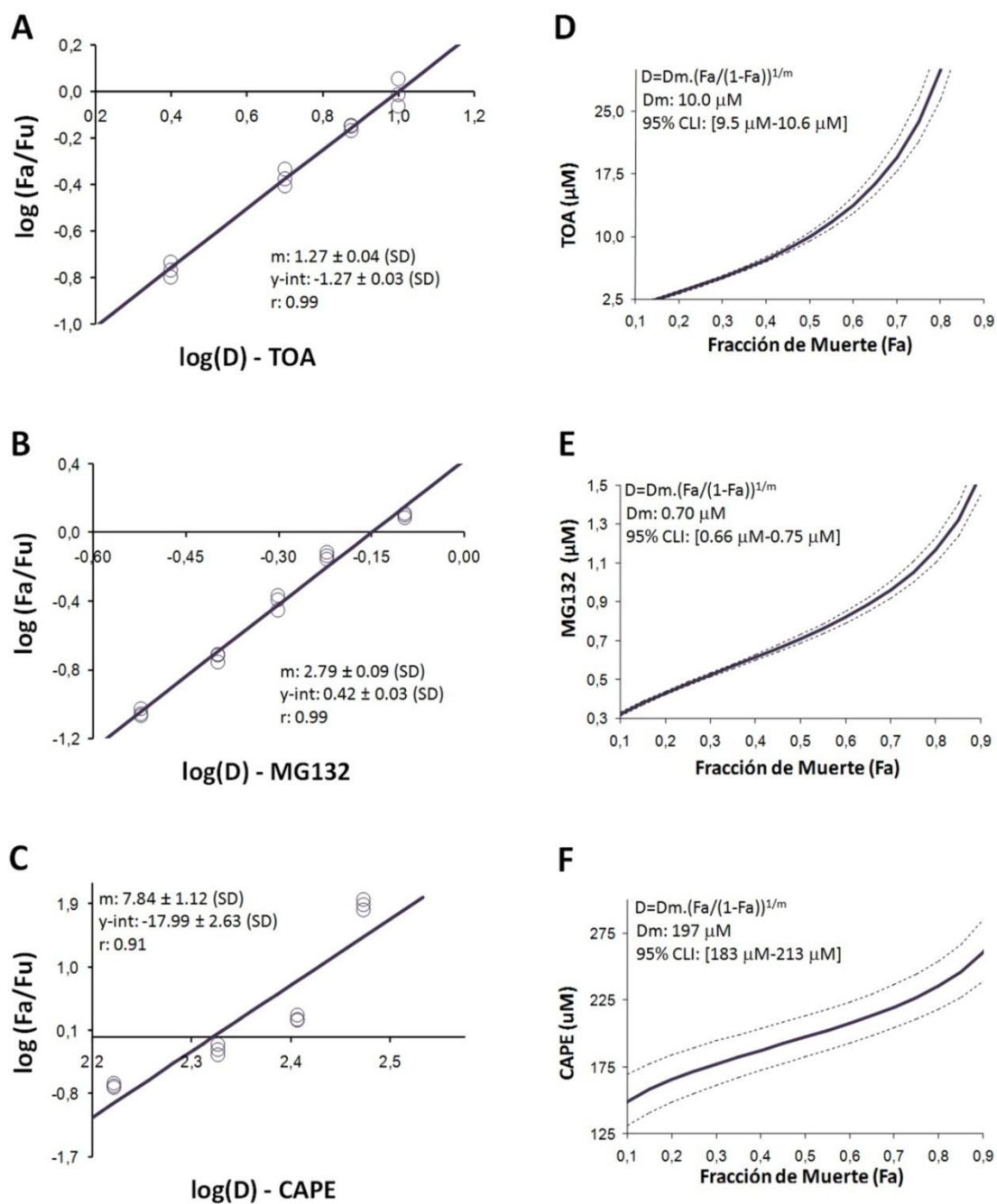


Figura 3.3. Cálculo del efecto citotóxico medio y curvas de predicción de efecto para las drogas individuales en la línea Raji. Se muestran los resultados experimentales por triplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media (Dm) de efecto citotóxico para las tres drogas individuales en la línea Raji (A, B y C). A partir de estos datos se calcularon las curvas de predicción de efecto (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (líneas punteadas) (D, E y F). m = pendiente de la recta de regresión, $y\text{-int}$ = valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación.

Nivel de Efecto (CE%) a 72h	TOA(μM) \pm SD	MG132(μM) \pm SD	CAPE(μM) \pm SD
Línea U937			
EC25	3.93 \pm 0.37	1.35 \pm 0.08	218 \pm 4
EC30	4.53 \pm 0.38	1.50 \pm 0.09	223 \pm 4
EC40	5.84 \pm 0.43	1.80 \pm 0.11	231 \pm 4
EC50	7.37 \pm 0.52	2.13 \pm 0.14	239 \pm 4
EC70	11.99 \pm 1.06	3.02 \pm 0.23	255 \pm 5
EC80	16.33 \pm 1.80	3.78 \pm 0.32	265 \pm 6
EC90	26.00 \pm 3.93	5.29 \pm 0.55	282 \pm 8
Línea Raji			
EC25	6.53 \pm 0.28	0.35 \pm 0.04	172 \pm 9
EC30	7.19 \pm 0.29	0.50 \pm 0.05	177 \pm 8
EC40	8.50 \pm 0.29	0.91 \pm 0.08	187 \pm 8
EC50	9.93 \pm 0.30	1.58 \pm 0.13	197 \pm 8
EC70	13.71 \pm 0.35	3.52 \pm 0.60	220 \pm 8
EC80	16.84 \pm 0.44	5.92 \pm 1.19	236 \pm 9
EC90	22.95 \pm 0.75	12.93 \pm 3.30	261 \pm 12

Tabla 3.1. CE de efecto citotóxico a 72hs calculadas para los tres tratamientos individuales. Se muestra un resumen de las CE a 72hs calculadas a partir de las curvas de predicción de efecto obtenidas para TOA, MG132 y CAPE en todo el rango de efecto citotóxico.

Resulta interesante resaltar que al comparar la respuesta de ambas líneas celulares frente a las drogas individuales, en cuanto a la dosis necesaria para alcanzar un efecto citotóxico dado, se observó que MG132 es el tratamiento que exhibe mayor potencia relativa en ambos casos, seguido de TOA y finalmente por CAPE. Por otro lado, al analizar la respuesta de ambas líneas frente a un tratamiento dado, se observa que con respecto al TOA, la línea U937 presenta mayor sensibilidad (CE50=7,37 μM) que la línea Raji (10,0 μM). Por el contrario U937 presentó mayor resistencia a MG132 y CAPE (2,1 μM y 247 μM respectivamente) en comparación con Raji (0,7 μM y 197 μM).

3.1.3 Efecto citotóxico de las combinatorias sobre las líneas celulares.

Al momento de realizar los ensayos de citotoxicidad con las combinaciones de drogas, se hizo necesario definir una relación molar fija entre los componentes de la combinatoria. En este sentido, se decidió definir dicha relación molar a partir del cálculo de la relación entre los efectos medios obtenidos para cada droga por separado. De esa forma quedó definida para la línea U937 una relación TOA:MG132 3:1 y TOA:CAPE 1:60, mientras que para la línea Raji resultaron ser TOA:MG132 12:1 y TOA:CAPE 1:35. Una vez definidas las relaciones molares a utilizar, se procedió a la realización de los ensayos de citotoxicidad con las combinatorias abarcando todo el rango de efecto en ambas líneas. Dichos ensayos se llevaron a cabo de la misma manera que aquellos realizados previamente con las drogas individuales, calculándose las CE50 y las correspondientes curvas de predicción de respuesta para todo el rango de efecto. En la línea U937 la CE50 para la combinatoria TOA+MG132 resultó ser de 2,89 μ M (Fig. 3.4A, B), lo que corresponde según la relación molar de la combinación a 2,17 μ M TOA+ 0,72 μ M MG132. En el caso de la combinación TOA+CAPE se obtuvo una CE50 de 230,6 μ M (Fig. 3.4C, D) resultando 3,8 μ M TOA + 226,8 μ M CAPE. Para la línea Raji, se obtuvo una CE50 de 8,08 μ M para la combinación TOA+MG132 (Fig. 3.5A, B) siendo 7,41 μ M y 0,67 μ M las contribuciones correspondientes de cada droga. En el caso de la combinatoria TOA+CAPE la CE50 obtenida fue 139,7 μ M (Fig. 3.5C, D) siendo la contribución correspondiente de cada componente 4,00 μ M de TOA y 135,7 μ M de CAPE.

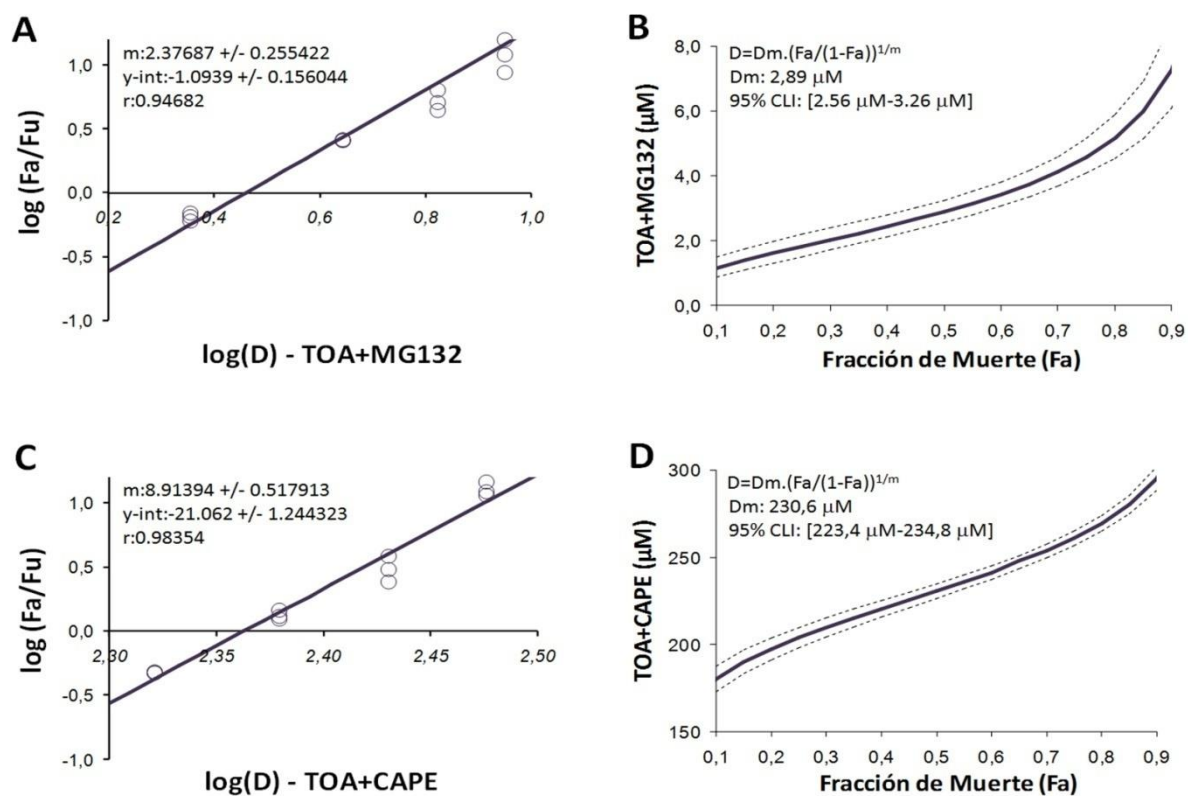


Figura 3.4. Cálculo del efecto citotóxico medio y curvas de predicción de efecto para los tratamientos combinados en la línea U937. Se muestran los resultados experimentales por triplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media (D_m) de efecto citotóxico para las combinatorias TOA+MG132 (relación molar 3:1)(A) y TOA+CAPE (relación molar 1:60) (C) en la línea U937. Curvas de predicción de efecto obtenidas para cada combinatoria (línea central) junto a los correspondientes intervalos de confianza del 95%(IC95%) (líneas punteadas) (B y D). m = pendiente de la recta de regresión, $y\text{-int}$ = valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación.

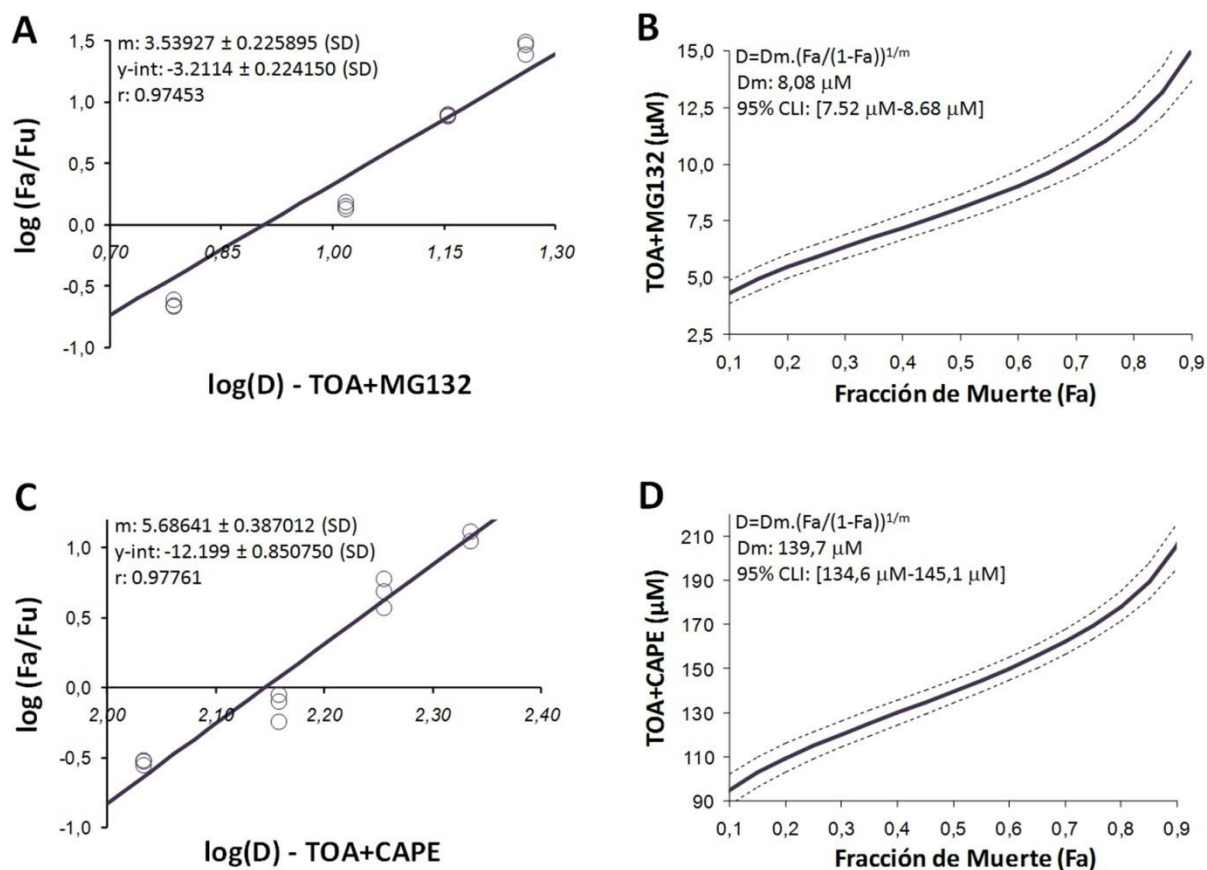


Figura 3.5. Cálculo del efecto citotóxico medio y curvas de predicción de efecto para los tratamientos combinados en la línea Raji. Se muestran los resultados experimentales por triplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media (D_m) de efecto citotóxico para las combinatorias TOA+MG132 (relación molar 12:1)(A) y TOA+CAPE (relación molar 1:35) (C) en la línea Raji. Curvas de predicción de efecto obtenidas para cada combinatoria (línea central) junto a los correspondientes intervalos de confianza del 95%(IC95%) (líneas punteadas) (B y D). m = pendiente de la recta de regresión, y -int= valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación

Al observar las curvas dosis respuesta (CDR) con valores experimentales obtenidos para los tratamientos combinados en comparación con los tratamientos individuales, se advierte en el caso del tratamiento TOA+MG132 en U937, un desplazamiento-hacia la izquierda de la curva con respecto a la posición media entre las curvas de los tratamientos individuales (Fig. 3.6A). Por el contrario, en el resto de los tratamientos combinados el desplazamiento se da hacia la derecha del punto medio (Fig. 3.6B, C y D).

Es importante notar esto, ya que el desplazamiento de la CDR de un tratamiento combinado hacia un lado u otro del punto medio entre las dos curvas de los tratamientos individuales, suele ser indicativo del tipo de interacción entre dichos compuestos (ver también Anexo I). Un desplazamiento hacia la izquierda (hacia la CDR de la droga con más potencia relativa) sugiere la presencia de sinergismo entre los componentes de la combinatoria mientras que un desplazamiento hacia la derecha (CDR del compuesto con menor potencia relativa) sugiere una interacción de tipo antagónica.

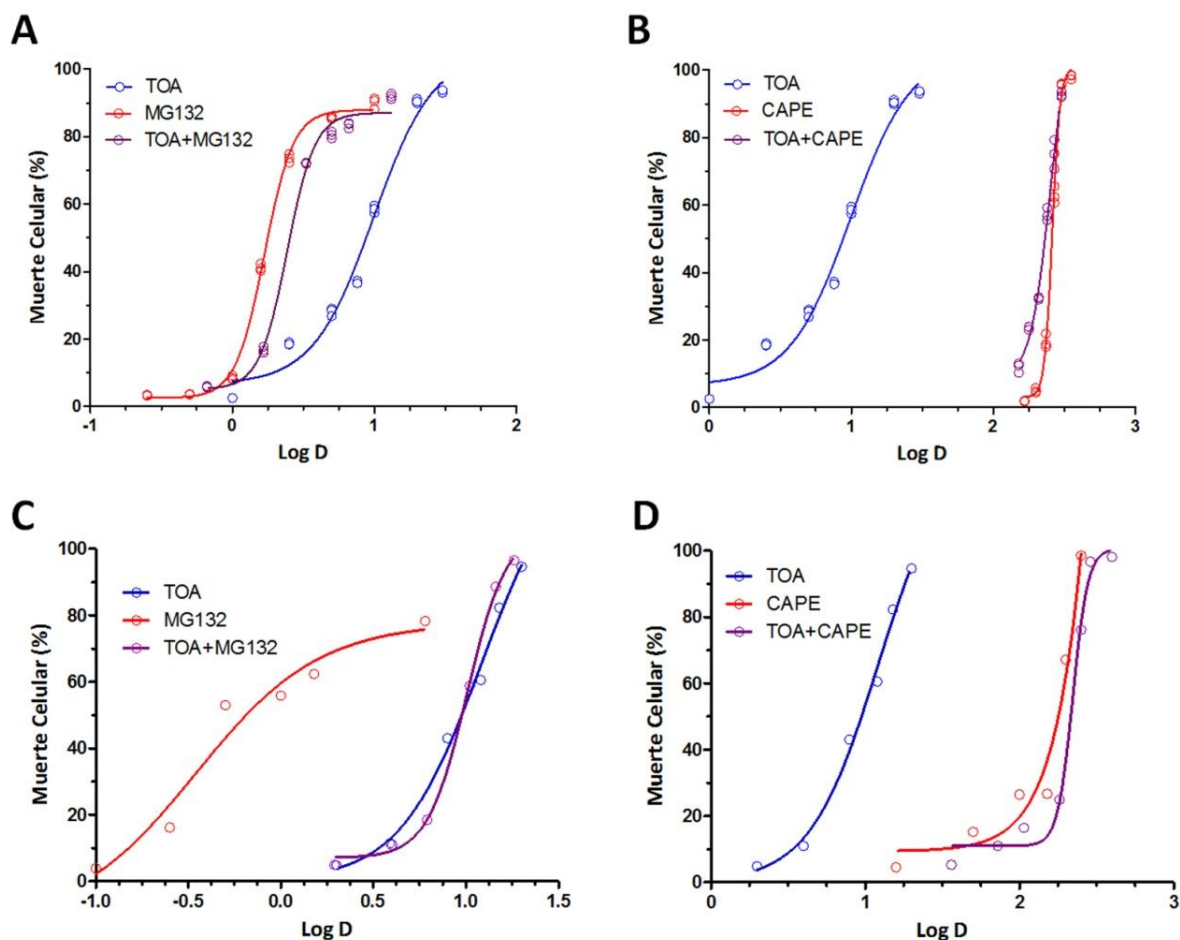


Figura 3.6. Curvas dosis-respuesta de citotoxicidad para los tratamientos individuales y combinados. Se muestran las curvas dosis respuesta de efecto citotóxico obtenidas en ambas líneas celulares para los tratamientos individuales y combinados, línea U937 (A y B), línea Raji (C y D). Los círculos corresponden a los valores experimentales y las líneas a la curva de ajuste. Puede observarse la potencia relativa de cada tratamiento en particular (los tratamientos que muestran más potencia relativa se ubican hacia la izquierda). Se muestra un ensayo representativo por tratamiento, los ensayos se repitieron al menos tres veces para cada tratamiento.

3.1.4 Determinación del tipo de interacción obtenida para las combinatorias

Una vez obtenidas las curvas de predicción de respuesta para los tratamientos individuales y combinados, se utilizaron las mismas para determinar y cuantificar el tipo de interacción existente entre los compuestos de cada combinatoria. Para esto, se calculó el Índice de combinación (CI) para todo el rango de efecto citotóxico en cada caso utilizando el método de Chou-Talalay. En la línea celular U937 la combinación TOA+MG132 mostró un CI menor a 1 en todo el rango de efecto citotóxico, indicando una interacción sinérgica (Fig. 3.7A). Por el contrario, la combinación de TOA+CAPE resultó en antagonismo en todo el rango citotóxico en esta línea celular (Fig. 3.7B). Contrariamente a lo observado en la línea U937, la combinación TOA+MG132 en las células Raji, resultó en antagonismo en todo el rango de efecto citotóxico con un $CI > 1$, especialmente a niveles de efecto bajos y medios. En niveles de efecto citotóxico altos, el CI se acerca a la línea de aditividad ($CI = 1$) e incluso llega a adentrarse en el área correspondiente a una interacción sinérgica ($CI < 1$). El intervalo de confianza de 95% alrededor de los valores de CI asegura que el antagonismo prevalece a lo largo de la mayor parte del rango de efecto (Fig. 3.7C). La combinación TOA+CAPE en Raji resultó antagónica a lo largo de todo el rango de efecto (Fig. 3.7D).

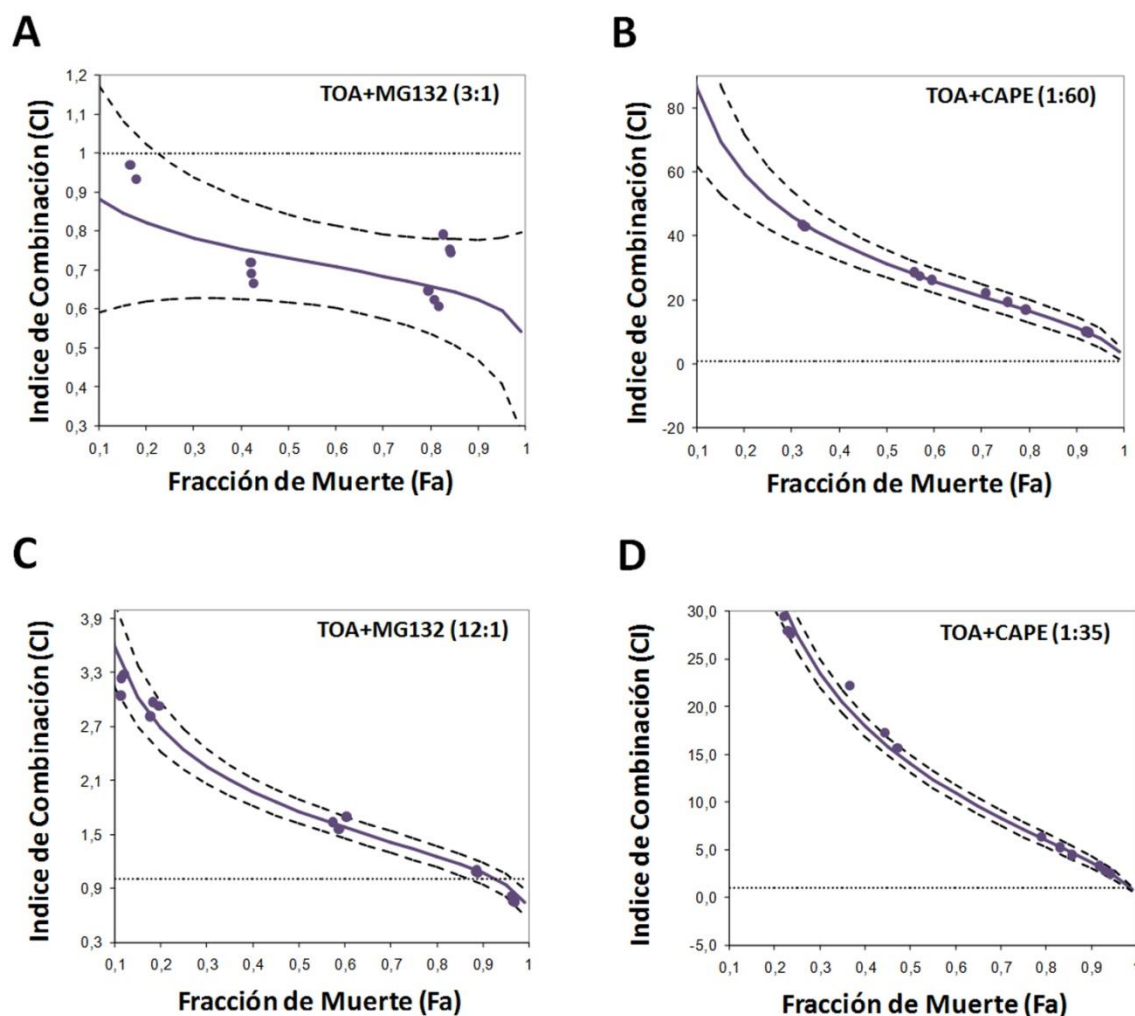


Figura 3.7. Cálculo del Índice de Combinación (CI) en cuanto al efecto citotóxico de los tratamientos combinados. Se muestra el CI calculado para todo el rango de efecto citotóxico (líneas continuas) con límites superiores e inferiores correspondientes a un IC95% (líneas discontinuas) para las combinatorias en la línea U937 (A,B) y Raji (C,D). Estas curvas se calcularon a partir de los CI obtenidos para los datos experimentales (círculos). $CI > 1$ antagonismo, $CI < 1$ sinergismo, $CI = 1$ aditividad (líneas punteadas).

En la [Fig. 3.8](#) se observa claramente la incidencia que tiene el tipo de interacción calculada previamente sobre el efecto citotóxico de los compuestos, al ser utilizados de manera combinada. Para el caso de la combinatoria TOA+MG132 en U937, que mostró ser sinérgica, se observa que el efecto citotóxico de la combinación es mayor a la sumatoria de efectos de ambas drogas por separado en dosis similares ([Fig. 3.8A](#)). Todo lo contrario ocurre en los casos de las combinaciones que resultaron antagonicas, es decir, TOA+CAPE en U937 y ambas combinatorias en la línea Raji ([Fig. 3.8B, C y D](#)). En estos casos el efecto generado por la combinación es menor

al de la sumatoria de efectos de las dos drogas por separado, utilizadas en dosis similares a la combinatoria.

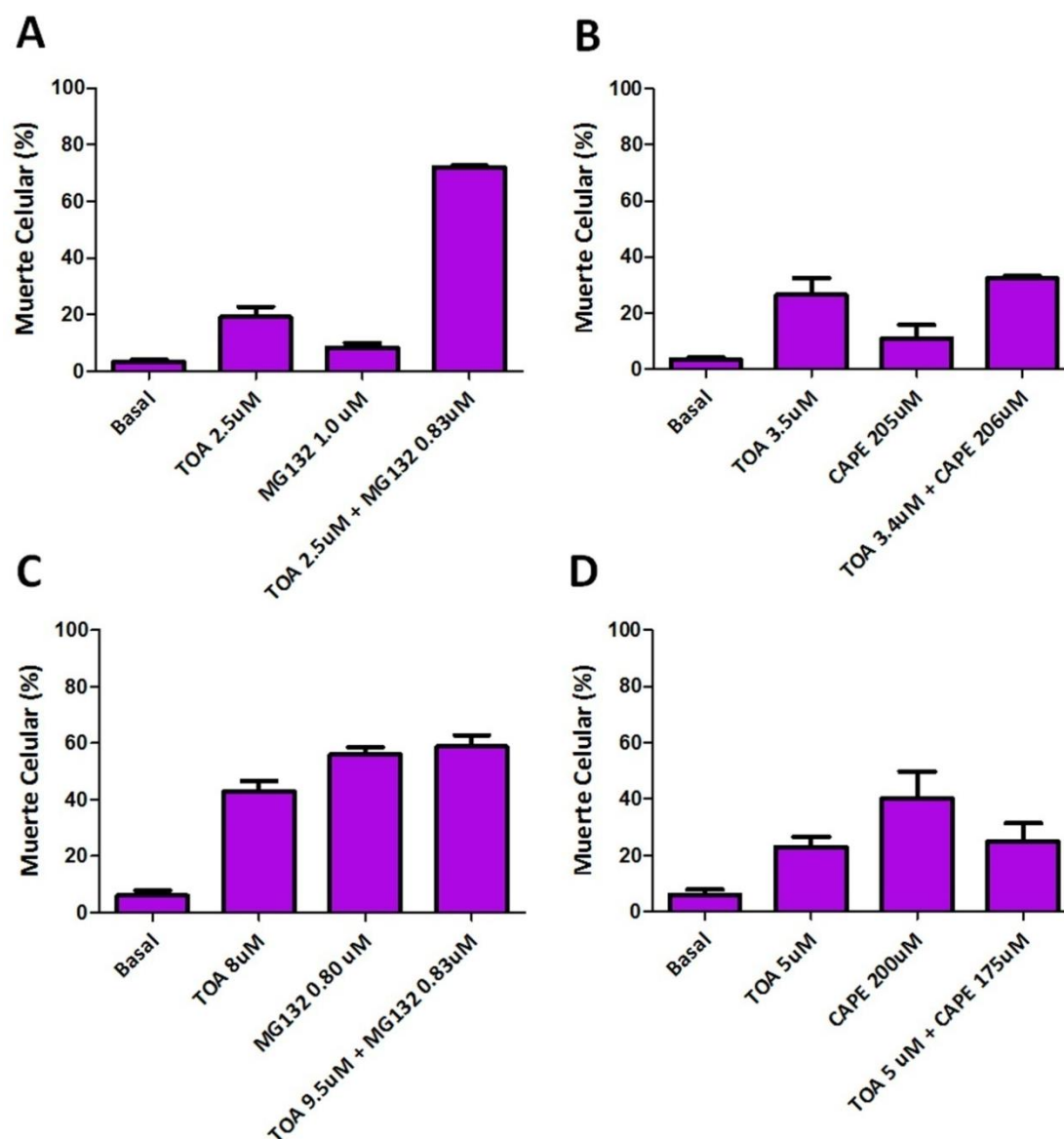


Figura 3.8. Porcentajes de muerte obtenidos para las dosis experimentales utilizadas en el cálculo de CI. Se muestran algunos de los valores de citotoxicidad para los tratamientos individuales y combinados obtenidos experimentalmente. Estos valores se utilizaron en el cálculo del CI para cada combinatoria mostrados en la Fig. 3.7 mediante el método de Chou-Talalay. Puede observarse que la combinatoria TOA+MG132 en la línea U937 genera un mayor efecto citotóxico que la suma de efectos de las dos drogas utilizadas por separado (A). Por otro lado, la combinatoria TOA+CAPE en esta línea genera un efecto menor a la suma de los efectos individuales (B). Lo mismo ocurre con ambas combinatorias en la línea Raji (C y D).

3.1.5 Efecto de las drogas individuales sobre la proliferación celular

A partir de los porcentajes de inhibición de la proliferación celular obtenidos mediante ensayos de incorporación de Timidina Triteriada ($[^3\text{H}]\text{-T}$) y mediante regresión logística, se obtuvieron las dosis de efecto inhibitorio medio (D_m) de TOA, MG132 y CAPE a 72hs de tratamiento en las células U937 y Raji. Luego se construyeron las curvas de predicción de efecto en todo el rango de efecto de inhibición de la proliferación (Fig. 3.9 y 3.10). A partir de este punto nos referiremos al valor inhibitorio medio (D_m) como concentración inhibitoria 50 (CI50). Al evaluar la capacidad inhibitoria de la proliferación, la CI50 calculada para TOA fue de 4.0 μM en U937 (Fig. 3.9A, D) y 2.2 μM en Raji (Fig. 3.10A, D). La CI50 de MG132 fue de 0.15 μM en U937 (Fig. 3.9B, E) y de 0.12 μM en Raji (Fig. 3.10B, E) mientras que para CAPE las CI50 fueron 70 μM y 34 μM en U937 y Raji respectivamente (Figs. 3.9C, F y 3.10C, F respectivamente). En todos los casos las CI50 fueron menores que las CE50 calculadas previamente, aunque las diferencias entre ambos valores varían en cada caso. Por ejemplo la relación entre la CE50 y la CI50 de TOA en U937 fue de 1,8 mientras que la misma relación para MG132 en esta línea fue de 14. En la línea Raji, la relación CE50/CI50 de los tres tratamientos arrojó valores cercanos a 5 en todos los casos.

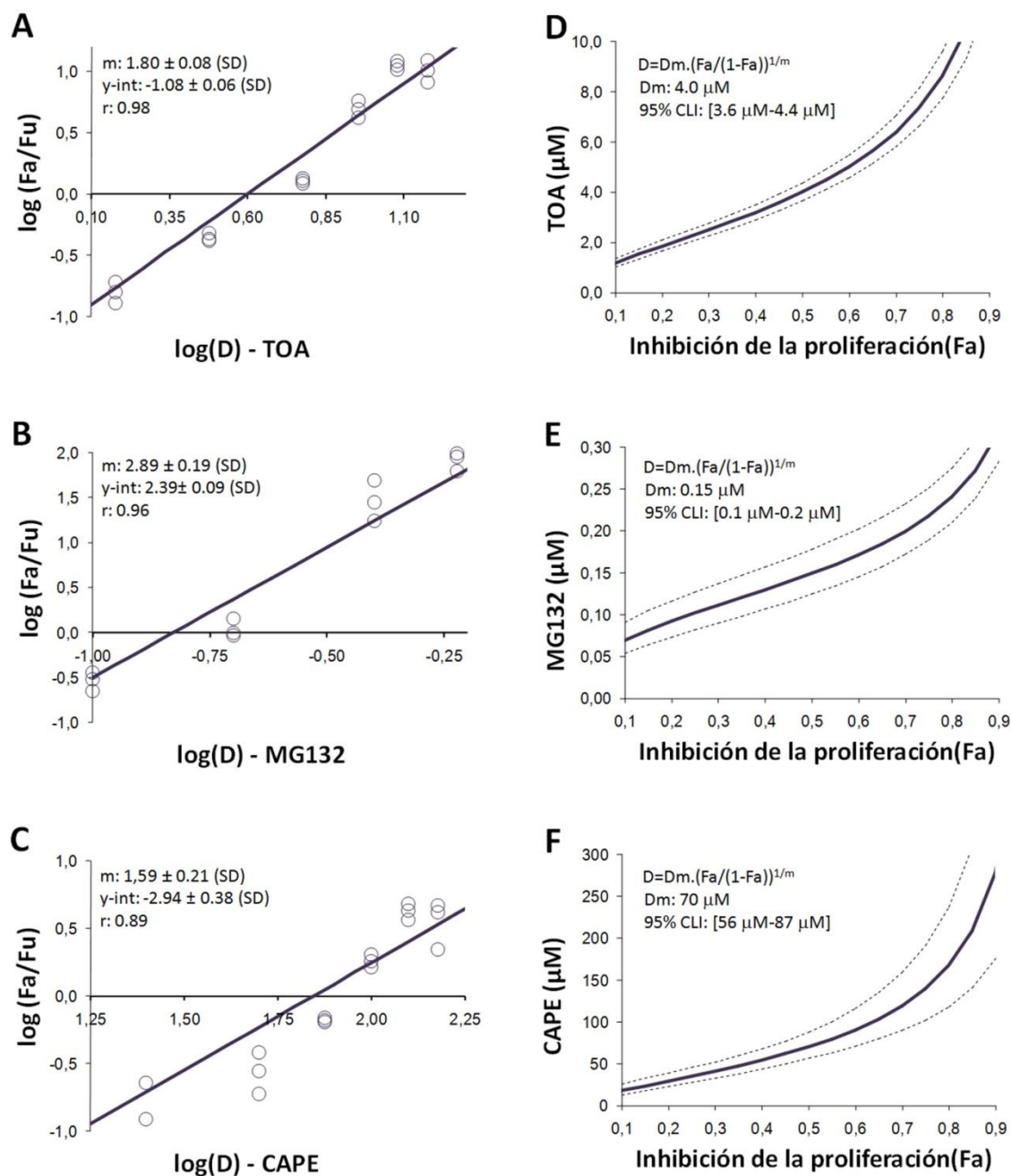


Figura 3.9. Cálculo del efecto medio de inhibición de proliferación (CI50) y curvas de predicción de efecto para las drogas individuales en U937. Se muestran los resultados experimentales por triplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media (CI50) de inhibición de la proliferación celular para las tres drogas individuales en la línea U937 (A, B y C). Curvas de predicción de efecto obtenidas para cada tratamiento individual (línea central) junto a los correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC95%) (líneas punteadas) (D, E y F). m = pendiente de la recta de regresión, $y\text{-int}$ = valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación

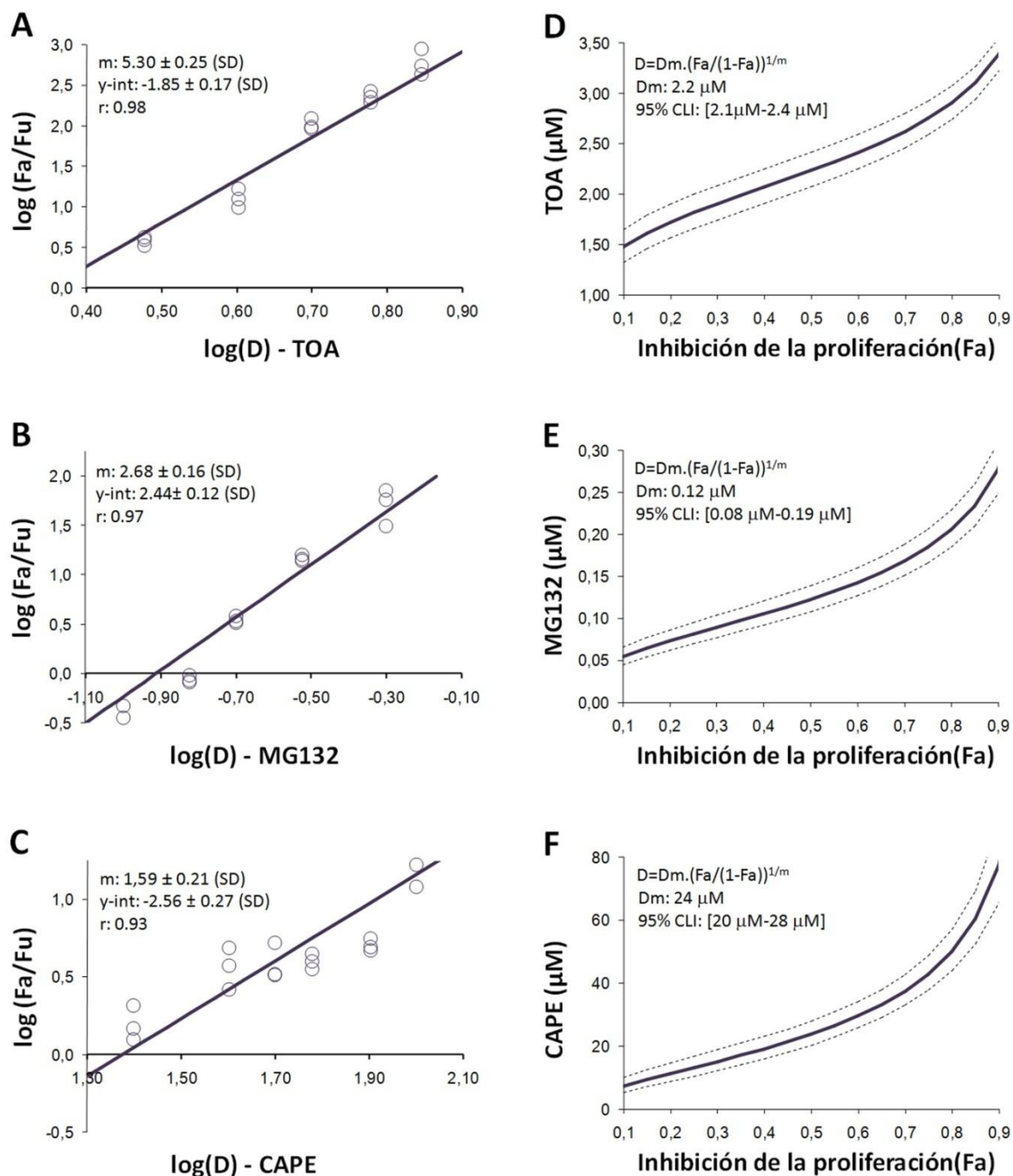


Figura 3.10. Cálculo del efecto medio de inhibición de proliferación (CI50) y curvas de predicción de efecto para las drogas individuales en Raji. Se muestran los resultados experimentales por triplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media (CI50) de inhibición de la proliferación celular para las tres drogas individuales en la línea Raji (A, B y C). Curvas de predicción de efecto obtenidas para cada tratamiento individual (línea central) junto a los correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC95%) (líneas punteadas) (D, E y F). m = pendiente de la recta de regresión, $y\text{-int}$ = valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación

3.1.6 Efecto de las combinaciones sobre la proliferación celular

Del mismo modo que en el caso del efecto citotóxico, se procedió a calcular la relación molar a utilizar para los tratamientos combinados a partir de relacionar las CI50 individuales de los compuestos a combinar. En este caso se obtuvo: TOA:MG132 6:1 y TOA:CAPE 1:27 para la línea U937, mientras que para la línea Raji fueron TOA:MG132 11:1 y TOA:CAPE 1:17.

Una vez determinadas las relaciones molares de las combinatorias, se procedió a realizar los ensayos combinados. En el caso de la línea U937, la combinatoria TOA+MG132 arrojó una CI50 de 1,27 μ M (Fig. 3.11A, B) mientras que en el caso de TOA+CAPE fue de 55,1 μ M (Fig. 3.11C, D). En la línea Raji se obtuvo una CI50 de 1,63 μ M para TOA+MG132 (Fig. 3.12A, B) y 16,1 μ M para TOA+CAPE (Fig. 3.12C, D).

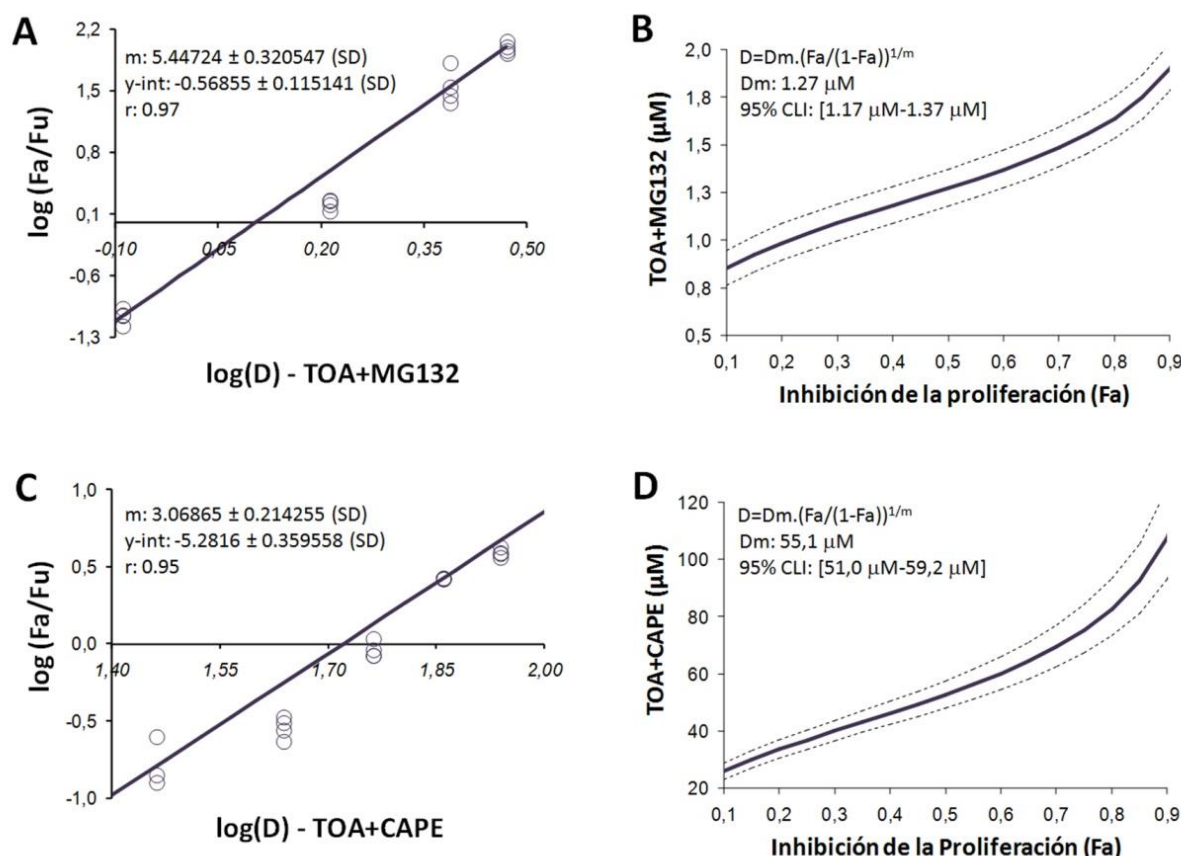


Figura 3.11. Cálculo del efecto medio de inhibición de proliferación (CI50) y curvas de predicción de efecto para los tratamientos combinados en la línea U937. Se muestran los resultados experimentales por cuadruplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media de inhibición de proliferación para las combinatorias TOA+MG132 (relación molar 6:1)(A) y TOA+CAPE (relación molar 1:27) (C) en la línea U937. Curvas de predicción de efecto obtenidas para cada combinatoria (línea central)

junto a los correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC95%) (líneas punteadas) (B y D). m = pendiente de la recta de regresión, y -int= valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación.

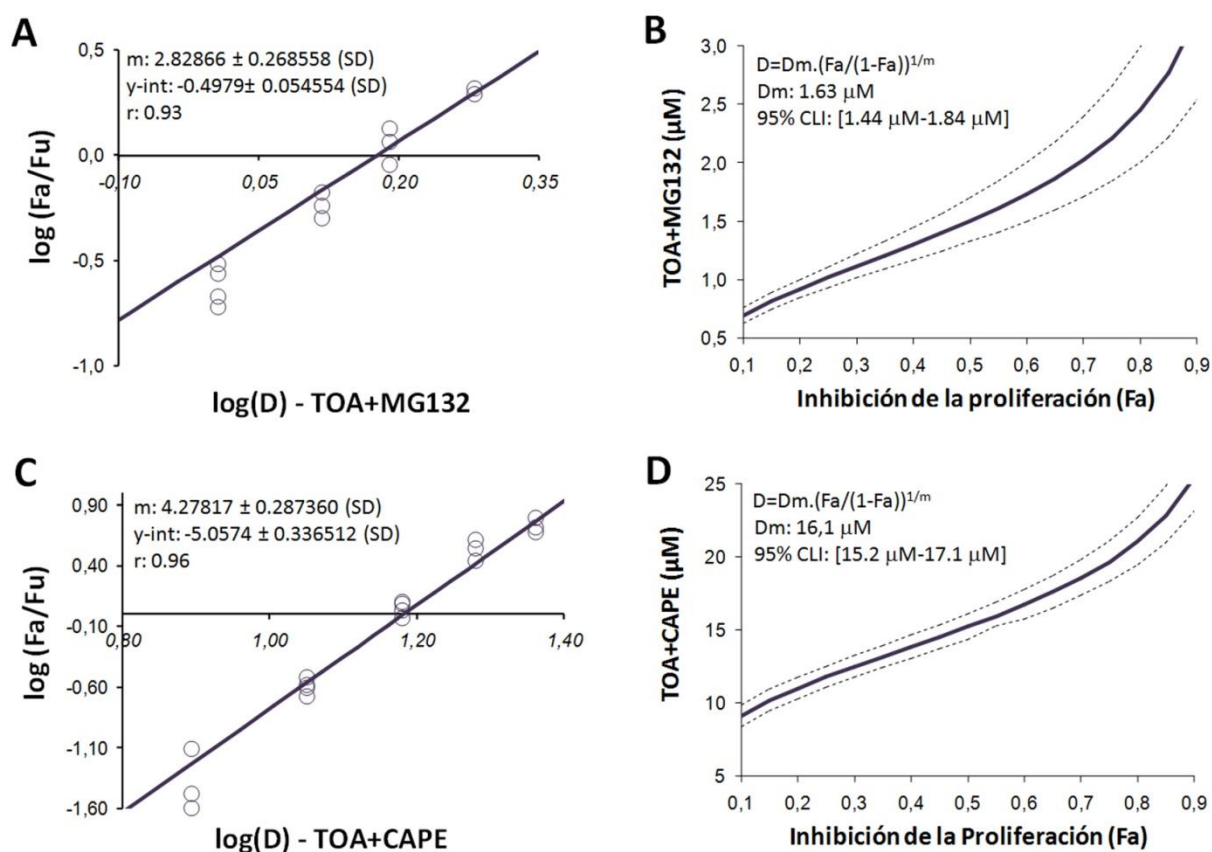


Figura 3.12. Cálculo del efecto medio de inhibición de proliferación (CI50) y curvas de predicción de efecto para los tratamientos combinados en la línea Raji. Se muestran los resultados experimentales por cuadruplicado (círculos abiertos) y la recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio, junto a los parámetros obtenidos para calcular la dosis media de inhibición de proliferación para las combinatorias TOA+MG132 (relación molar 11:1) (A) y TOA+CAPE (relación molar 1:17) (C) en la línea Raji. Curvas de predicción de efecto obtenidas para cada combinatoria (línea central) junto a los correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC95%) (líneas punteadas) (B y D). m = pendiente de la recta de regresión, y -int= valor de intersección del eje y correspondiente al valor $\log(D)=0$, r = coeficiente de correlación.

A partir de las curvas de predicción de respuesta y con el objetivo de determinar el tipo de interacción que se genera entre los componentes de las combinatorias en cuanto a la inhibición de la proliferación, se calcularon los CI correspondientes en todo el rango de efectos (Fig.13). Al contrario de lo que se observó en la línea U937 para el efecto citotóxico, la combinación TOA+MG132 reveló un $CI > 1$ (Fig. 3.13A) en todo el rango de efecto inhibitorio indicando una

interacción antagónica. Lo mismo ocurrió con la combinatoria TOA+CAPE en esta línea (Fig. 3.13B), aunque en este caso el antagonismo fue notoriamente mayor que el de TOA+MG132.

Por otro lado, ambas combinatorias mostraron antagonismo a lo largo de todo el rango de efecto en la línea Raji en cuanto a la inhibición de la proliferación, en coincidencia con lo ocurrido en el caso del efecto citotóxico (Fig. 3.13C y D).

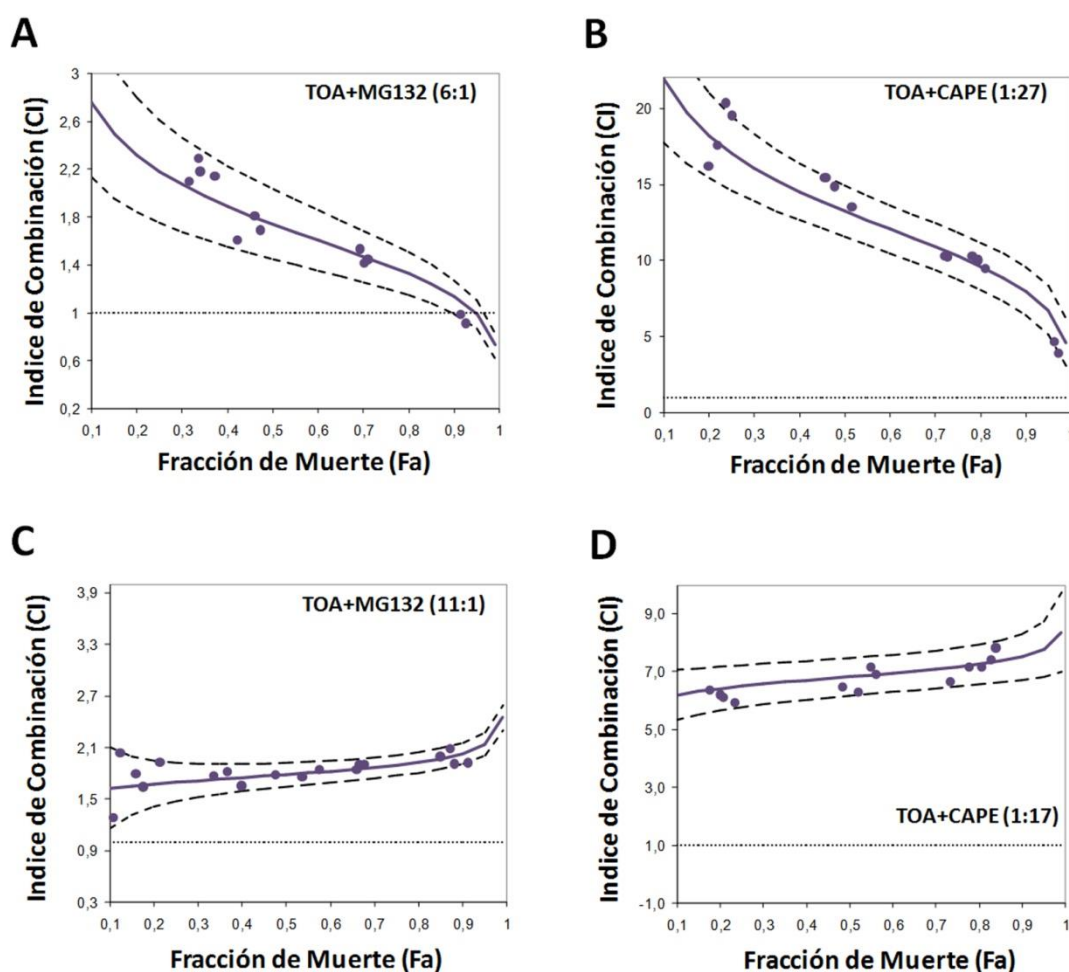


Figura 3.13. Cálculo del Índice de Combinación (CI) en cuanto a la inhibición de la proliferación para los tratamientos combinados. Se muestra el CI calculado para todo el rango de efecto citotóxico (líneas continuas) con límites superiores e inferiores correspondientes a un IC95% (líneas discontinuas). Estas curvas se calcularon a partir de los CI obtenidos para los datos experimentales (círculos). $CI > 1$ antagonismo, $CI < 1$ sinergismo, $CI = 1$ aditividad (líneas punteadas).

3.2 Modificación en la producción de anión superóxido inducida por TOA, MG132 y CAPE en el rango de dosis con efecto citotóxico

Como se mencionó oportunamente, el TOA es capaz de generar un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Dentro de este grupo de sustancias, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es el compuesto que parece tener mayor relevancia en el mecanismo de citotoxicidad inducido por el Arsénico 3+. Entre las fuentes celulares de producción de $O_2^{\cdot-}$ mediado por TOA se cuentan la alteración de la cadena de transporte de electrones debido al daño que ejerce sobre la mitocondria y la alteración de la actividad de diversos grupos enzimáticos con actividad oxidante (Chou *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008a; Sumi *et al.*, 2010). Es por esto que decidimos estudiar el efecto de los tratamientos individuales y combinados en lo que respecta a la producción de $O_2^{\cdot-}$ sobre las líneas celulares. Para esto se utilizó la sonda dihidroetidina (HE), la cual al ingresar a la célula y al ser oxidada de manera específica por este radical aumenta su fluorescencia. Los cambios en la fluorescencia de HE inducidos por los tratamientos en las líneas U937 y Raji se analizaron por citometría de flujo.

3.2.1 Efecto individual de TOA, MG132 y CAPE en la producción de $O_2^{\cdot-}$

Cuando se expusieron las células U937 durante 6hs a las dosis de CE25 CE50 y CE70 de TOA calculadas, se observó, según lo esperado, un incremento en la fluorescencia para HE al compararla con los niveles basales obtenidos en células no tratadas (Fig. 3.14A). El incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ frente al tratamiento con TOA se mantuvo en U937 luego de 24hs de incubación (Fig. 3.14B). Un perfil de incremento del $O_2^{\cdot-}$ dosis dependiente similar al anterior se observó al tratar las células Raji con TOA durante 6 y 24 hs (Fig. 3.14C y D respectivamente). El tratamiento de las células U937 con CE10 CE25 y CE50 de MG132 por 6 y 24hs no generó cambios apreciables en la producción de $O_2^{\cdot-}$ con respecto a los valores basales (Fig. 3.15A y B). Se observaron resultados similares en la línea Raji a 6hs (Fig. 3.15C), sin embargo a 24hs de tratamiento se observó un incremento dosis dependiente de la producción $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 3.15D). En el caso del tratamiento con CAPE, la producción de $O_2^{\cdot-}$ se incrementó notoriamente en ambas líneas luego de 6hs de tratamiento con las CE10, CE25 y CE50 alcanzando valores de mediana que superaron los obtenidos para el control positivo (Fig. 3.16A, C). En los ensayos a 24hs de tratamiento con CAPE, la producción de $O_2^{\cdot-}$ se incrementó notoriamente en el caso de las CE10 y CE25, aunque niveles menores se observaron para la CE50 en ambas líneas, especialmente al compararlas con los niveles generados a 6hs de tratamiento (Fig. 3.16B, D).

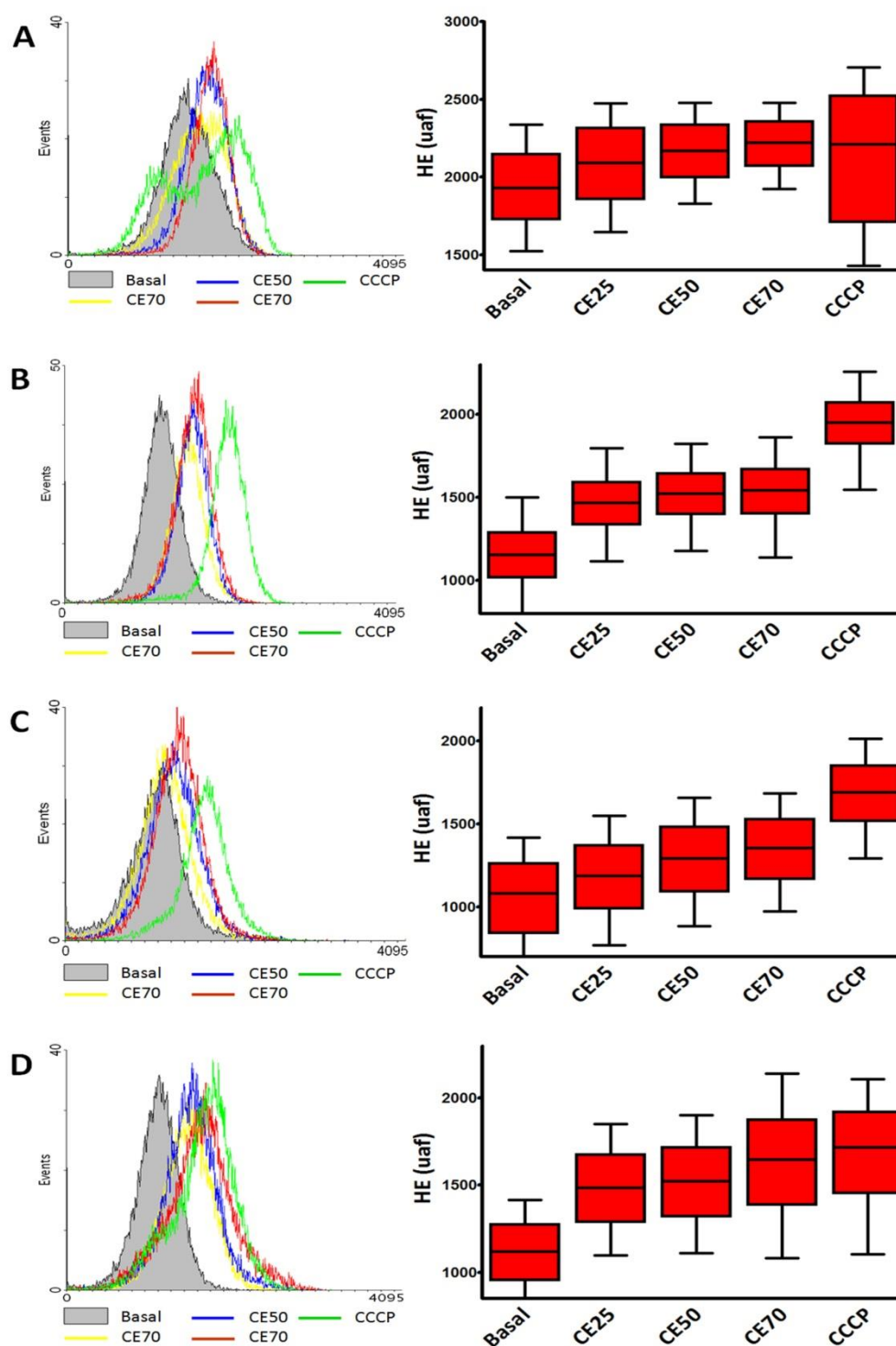


Figura 3.14. Producción de O_2^- en células tratadas con TOA. Histogramas de fluorescencia de HE (izquierda) y diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia (derecha) obtenidos para los tratamientos con TOA en la línea U937 a 6hs (A) y 24hs (B) y en la línea Raji a 6hs y 24 hs (C y D respectivamente). La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. Para U937 las CE25, CE50 y CE70 fueron 3.9, 7.4 y 12.0 μM respectivamente y para Raji 4.2, 10,0 y 19.5 μM en el mismo orden.

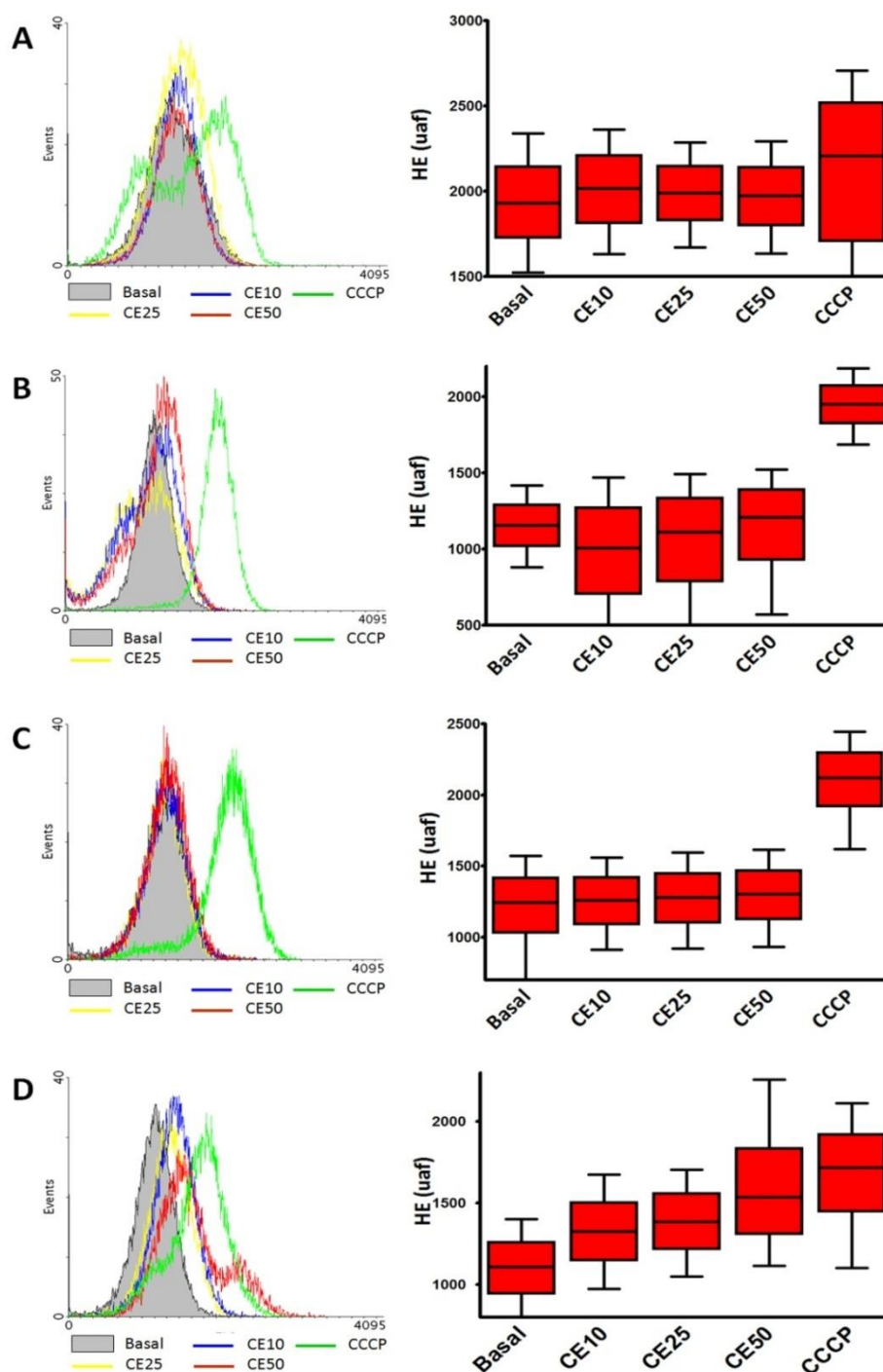


Figura 15. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en células tratadas con MG132. Histogramas de fluorescencia de HE (izquierda) y diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia (derecha) obtenidos para los tratamientos con MG132 en la línea U937 a 6hs (A) y 24hs (B) y en la línea Raji a 6hs y 24 hs (C y D respectivamente). La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. Para U937 las CE25, CE50 y CE70 fueron 0.86, 1.35 y 2.13 μ M respectivamente y para Raji 0.32, 0.48 y 0.70 μ M en el mismo orden.

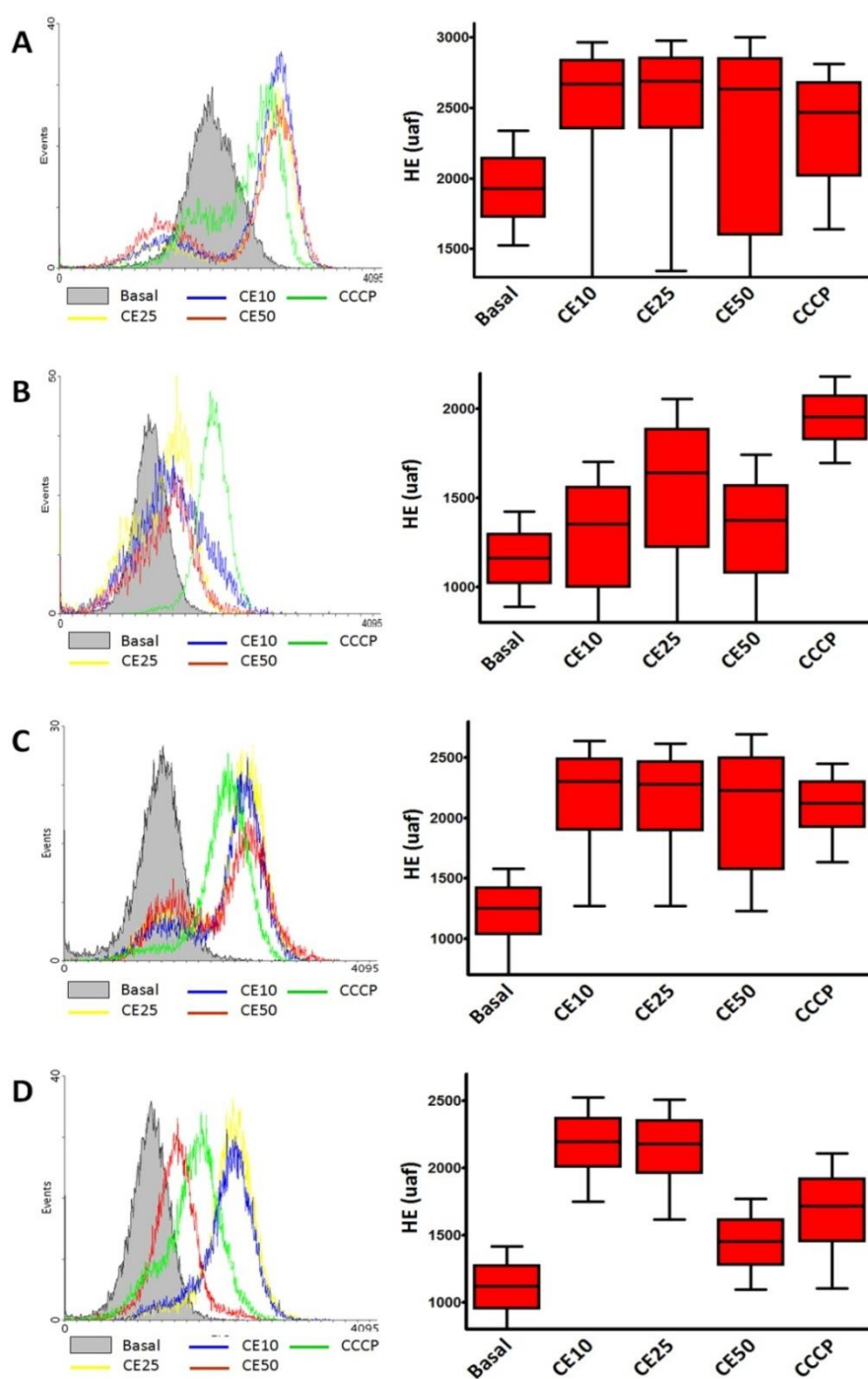


Figura 3.16. Producción de O_2^- en células tratadas con CAPE. Histogramas de fluorescencia de HE (izquierda) y diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia (derecha) obtenidos para los tratamientos con CAPE en la línea U937 a 6hs (A) y 24hs (B) y en la línea Raji a 6hs y 24 hs (C y D respectivamente). La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. Para U937 las CE25, CE50 y CE70 fueron 205, 225 y 247 μ M respectivamente y para Raji 149, 172 y 197 μ M en el mismo orden.

3.2.2 Efecto combinado de TOA, MG132 y CAPE en la producción de O_2^-

Se evaluaron luego las combinatorias TOA+MG132 y TOA+CAPE en cuanto a su efecto sobre la producción de O_2^- a 6 y 24hs en ambas líneas celulares al igual que lo realizado para las drogas individuales. Para ello se utilizaron las mismas relaciones molares y CE calculadas para la determinación de efecto citotóxico a 72hs.

La combinación de las de TOA+MG132 (CE25+CE25) en la línea U937 a 6hs generó niveles de O_2^- más bajos que los alcanzados por la CE50 de TOA, sólo pero mayores a los obtenidos para la CE50 de MG132 (Fig. 3.17A, panel superior). A 24hs de tratamiento, esta misma combinación generó valores de fluorescencia de HE más bajos que cualquiera de las dos drogas individuales e incluso, en algunos casos, más bajos que los valores observados para el basal (Fig. 3.17A, panel inferior).

Por el contrario el tratamiento TOA+CAPE (CE25+CE25) en las células U937 resultó en valores de O_2^- más altos que los generados por la CE50 de TOA solo tanto a 6hs como a 24hs (Fig. 3.17B).

En la línea Raji, el tratamiento combinado TOA+MG132 generó valores de O_2^- inferiores a los generados por TOA de manera individual a 6hs y 24hs mientras que la combinación TOA+CAPE mostró niveles de O_2^- mayores a los generados por el TOA sólo (Fig.18).

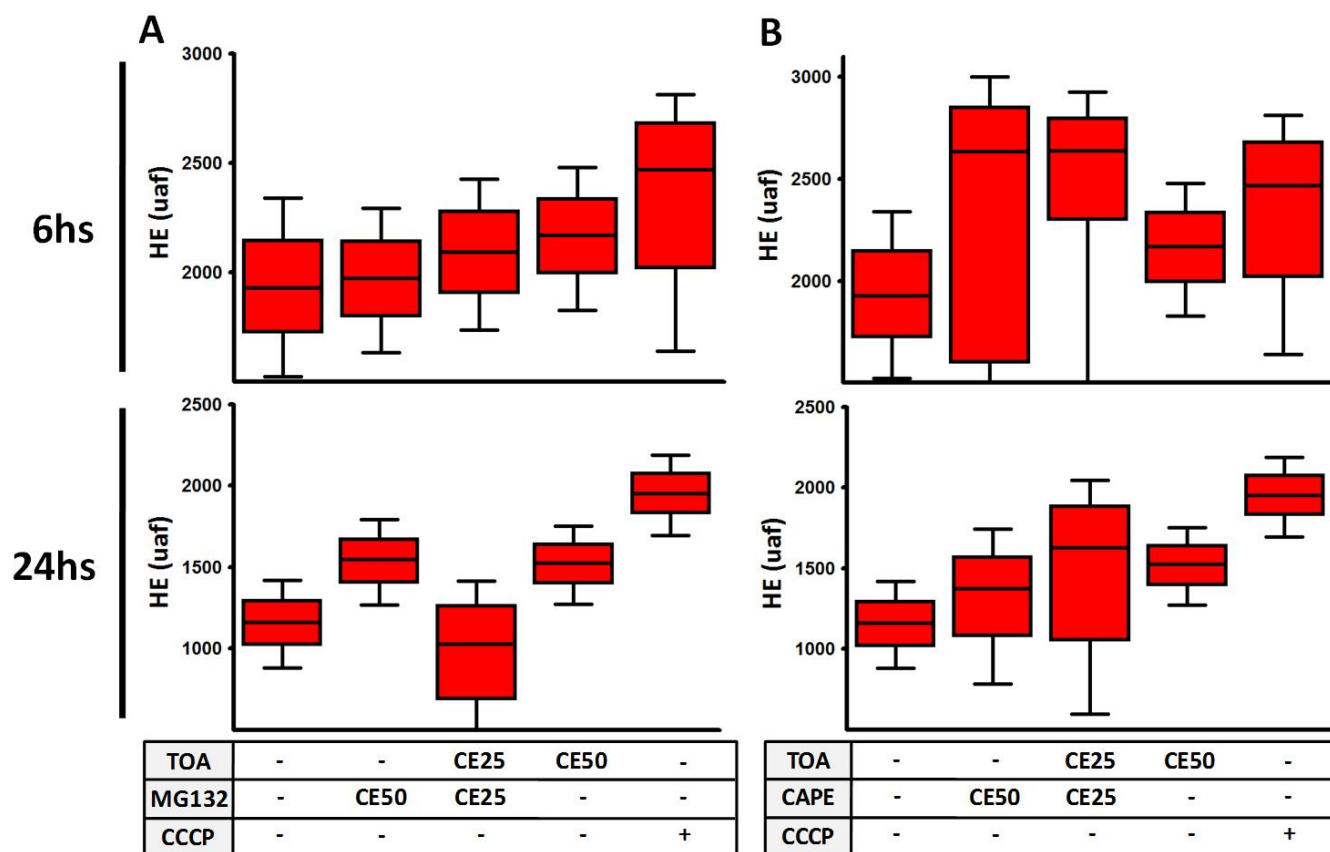


Figura 3.17. Producción de O₂- para los tratamientos combinados en U937. Diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia obtenidos utilizando la sonda HE para los tratamientos individuales y combinados TOA+MG132 (A) y TOA+CAPE (B) en la línea U937 a 6hs (paneles superiores) y 24hs (paneles inferiores). La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Control positivo: CCCP 50 μ M. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. Las CE de todos los tratamientos son las explicitadas en figuras anteriores.

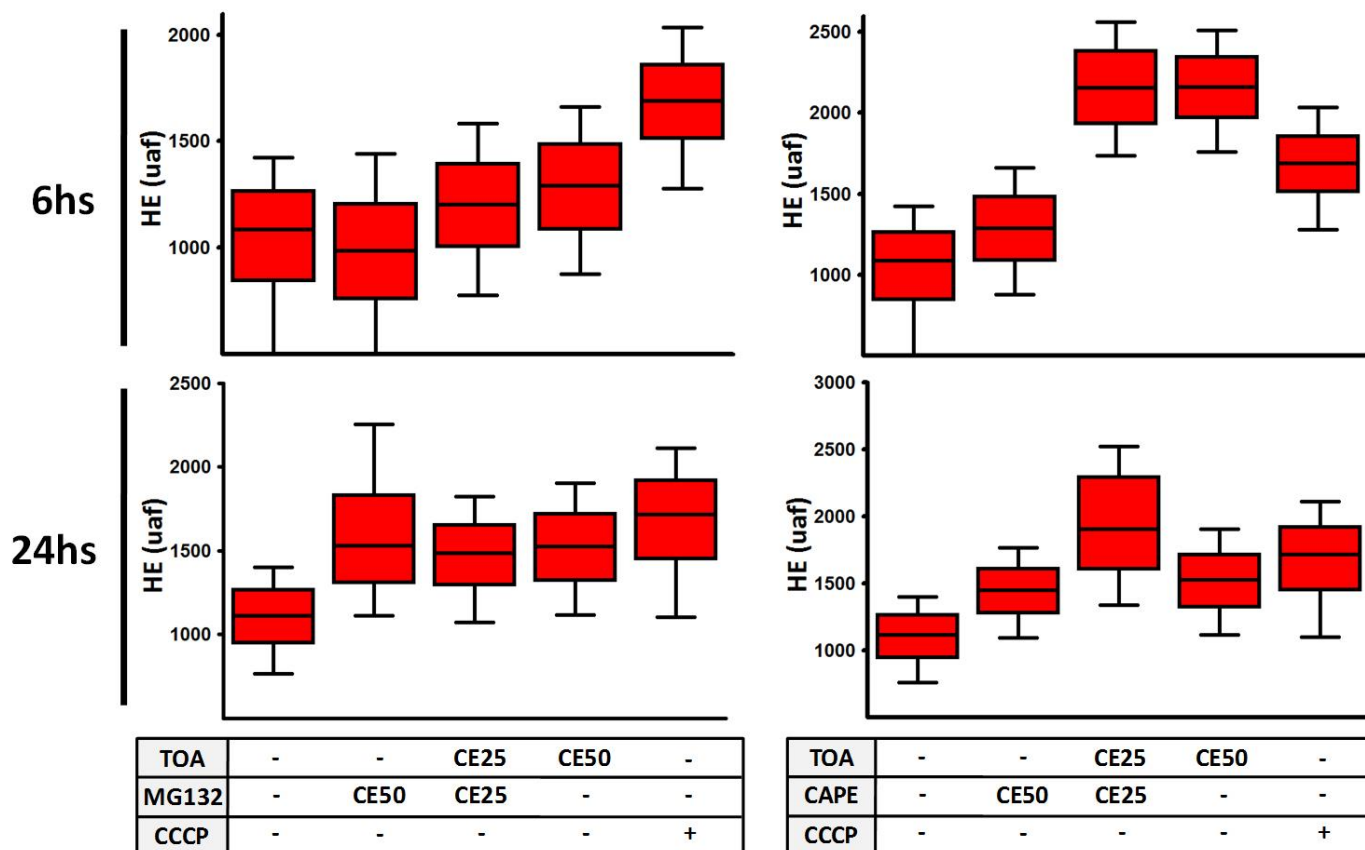


Figura 3.18. Producción de O₂- para los tratamientos combinados en Raji. Diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia obtenidos con HE para los tratamientos individuales y combinados TOA+MG132 (A) y TOA+CAPE (B) en la línea Raji a 6hs (paneles superiores) y 24hs (paneles inferiores). La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Control positivo: CCCP 50 μ M. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. Las CE de todos los tratamientos son las explicitadas en figuras anteriores

Con el objetivo de lograr una interpretación más clara de los resultados obtenidos en los ensayos de HE, se calculó para cada tratamiento un Índice de cambio de fluorescencia. El mismo, se obtuvo a partir de relacionar las medianas de fluorescencia de un tratamiento particular y la del basal para ese ensayo. De esta manera, se pueden observar claramente los incrementos y decrementos relativos en la fluorescencia de HE generados por los tratamientos, evitándose el error inter ensayo generado por diferencias en la carga de la sonda durante cada experimento particular.

A partir de estos datos, se analizó la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento y el basal. En cuanto a los tratamientos individuales, se registraron aumentos significativos para TOA en ambas líneas celulares a 6 y 24hs. Lo mismo ocurrió con CAPE en todos los casos, observándose incrementos mayores a los generados por TOA. Por el contrario, MG132 no generó diferencias significativas en ningún caso.

Se observó que la combinatoria TOA+MG132 en la línea U937 no provocó diferencias significativas con respecto al basal a 6 o 24hs de tratamiento. Por el contrario, si se registró un aumento significativo de O_2^- en la línea Raji a 24hs al ser tratada con esta combinatoria (Fig. 3.19A). Vale la pena recordar que TOA+MG132 había resultado en sinergismo en cuanto al efecto citotóxico en la línea U937 y antagonismo en la línea Raji. Para el caso de la combinatoria TOA+CAPE que había resultado antagónica para el efecto citotóxico en ambas líneas celulares, se observó que en todos los casos se genera un incremento significativo para los dos tiempos ensayados (Fig. 3.19B).

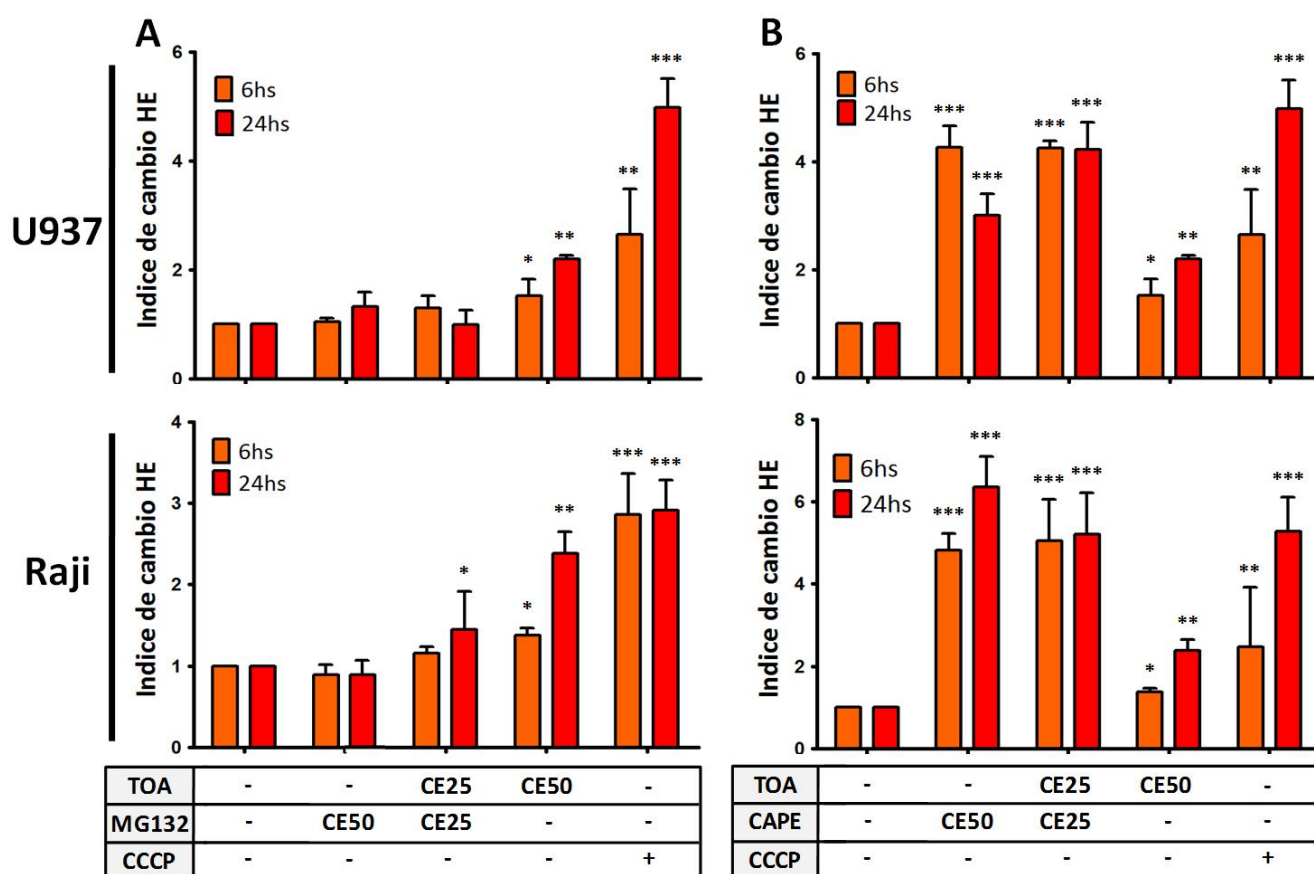


Figura 3.19. Resumen de producción de anión superóxido inducida por TOA, MG132 y CAPE.

Gráficos de barras que muestran el índice de cambio de fluorescencia de HE con respecto al basal a 6 y 24hs de tratamiento individual o combinado entre TOA y MG132 (A) y TOA y CAPE (B). El índice de cambio (IC) se calculó como: $IC = \text{mediana de fluorescencia del tratamiento} / \text{mediana de fluorescencia del basal}$,

a partir de los datos obtenidos de tres o más experimentos independientes en cada caso. La presencia de diferencias significativas con respecto al basal se evaluó mediante el Test de Kruskal-Wallis seguida de un post-test de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los valores de CE correspondientes son los mismos que se detallan en figuras anteriores.

Estos resultados sugieren que la generación de un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ se asocia a un efecto antagónico en cuanto al efecto citotóxico inducido por la combinatoria. Este hecho se contrapone a la idea general de que cuanto mayor es el nivel de ERO inducido por un tratamiento particular, mayor será el daño producido y por ende se incrementaría la efectividad de un tratamiento combinado. Paradójicamente, el único tratamiento que resultó sinérgico (TOA+MG132 en la línea U937), fue aquel que no generó un incremento significativo en los niveles de $O_2^{\cdot-}$.

3.2.3 Modificaciones en los niveles de GSH inducidos por TOA y MG132

Como ya se mencionó anteriormente, el GSH constituye una de las defensas antioxidantes más importantes con las que cuenta la célula para evitar el daño oxidativo generado por las ERO. Los niveles intracelulares de esta molécula pueden variar en respuesta a diferentes estímulos (Pietarinen-Runtti *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2011). Es por esto que decidimos estudiar de qué manera se ven afectados los niveles intracelulares de GSH en respuesta a los tratamientos en estudio. Para esto, se realizaron ensayos de citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente 5-CMF, la cual es capaz de unirse covalentemente al GSH. De la misma manera que se procedió en los ensayos de HE, a partir de los datos obtenidos en las citometrías, se construyeron los correspondientes diagramas de Box-Whisker utilizando las medianas y cuartiles de fluorescencia para los tratamientos individuales y combinados en ambas líneas celulares (Figs. 3.20 y 3.21).

En la línea U937 tratada con MG132 durante 6hs, no se observaron grandes cambios en intensidad de señal con respecto al estado basal, mientras que se observó un ligero aumento a 24hs. En el caso de TOA tampoco se observaron cambios importantes a 6hs, aunque luego de 24hs apareció un marcado incremento de los niveles de GSH con respecto al basal. Por último, la combinatoria TOA+MG132 mostró un efecto diferente a los tratamientos individuales, observándose una disminución de GSH a 6hs y un incremento a las 24hs, aunque este último es de menor magnitud que el observado para TOA como droga única a 6hs (Fig. 3.20A). En el caso de CAPE, tanto el tratamiento individual como combinado generaron un leve aumento de los niveles de GSH a 6hs haciéndose este efecto mucho más notorio luego de 24hs (Fig. 3.20B).

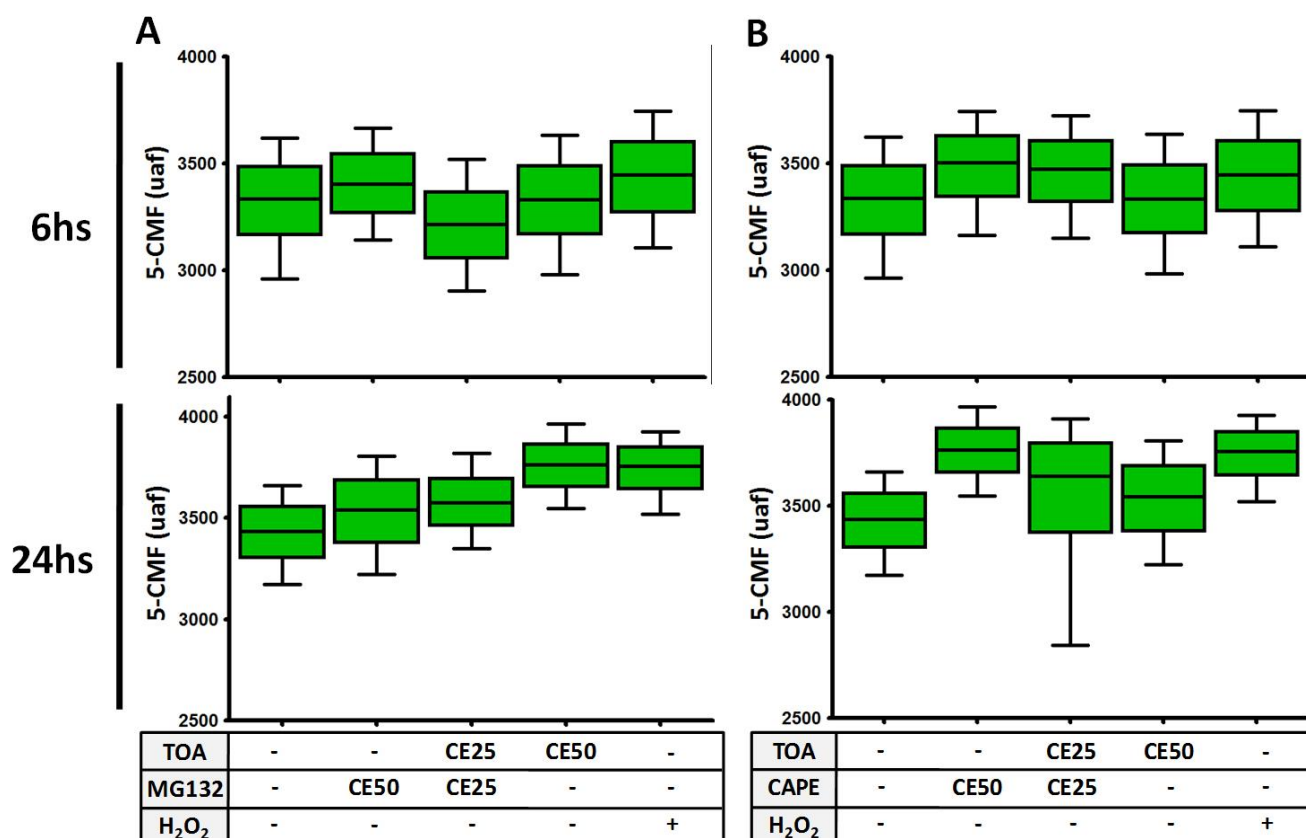


Figura 3.20. Cambios en los niveles de GSH inducidos por los tratamientos en U937. Diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia obtenidos mediante marcación con 5-CMF para los tratamientos individuales y combinados TOA+MG132 (A) y TOA+CAPE (B) en la línea U937 a 6hs (paneles superiores) y 24hs (paneles inferiores). La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Control positivo: H₂O₂ 0.5mM. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. Las CE de todos los tratamientos son las explicitadas en la (Tabla 3.1).

En el caso de la línea Raji, el tratamiento individual con MG132 no provocó cambios apreciables respecto del basal en los niveles de GSH, mientras que para TOA se observó una disminución desde las 6hs de tratamiento que se hizo más marcada a 24hs. Un comportamiento similar al de TOA se evidenció para la combinatoria TOA+MG132 en donde se observó una disminución de la fluorescencia de 5-CMF a 6hs y 24hs de tratamiento (Fig.21A). CAPE generó también una disminución en los niveles de GSH para los dos tiempos ensayados mostrando un comportamiento similar al TOA. Finalmente, si bien para la combinatoria TOA+CAPE se observó una reducción de la señal a 6hs similar a la generada por TOA o CAPE de manera individual, a 24hs de tratamiento se observa una disminución mayor a la generada por cualquiera de las dos

drogas por separado, alcanzando niveles similares a los observados para el control de H₂O₂ (Fig.21B).

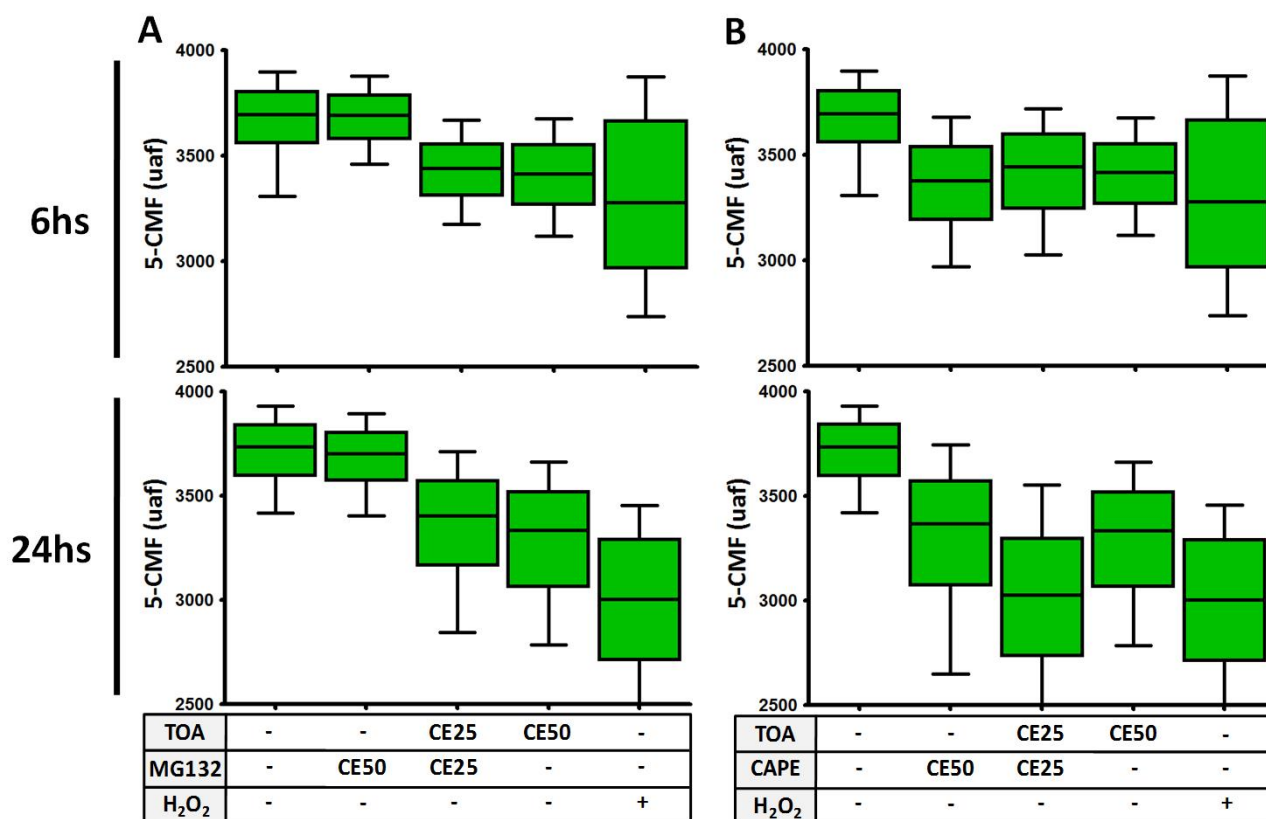


Figura 3.21: Cambios en los niveles de glutatión inducidos por los tratamientos en Raji.

Diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia obtenidos mediante marcación con 5-CMF para los tratamientos individuales y combinados TOA+MG132 (A) y TOA+CAPE (B) en la línea Raji a 6hs (paneles superiores) y 24hs (paneles inferiores). La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Control positivo: H₂O₂ 0,5mM. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. Las CE de todos los tratamientos son las explicitadas en la (Tabla 3.1).

Posteriormente y del mismo modo en que se procedió para los ensayos con HE, se calculó a partir de tres o más experimentos independientes un índice de cambio de fluorescencia de 5-CMF. Esto se realizó para cada uno de los tratamientos ya sean individuales o combinados, con el objetivo de evidenciar en cada caso la presencia de diferencias estadísticamente significativas con respecto al basal en cuanto a los niveles de GSH intracelular (Fig. 3.22).

A partir de dicho análisis puede observarse claramente como el tratamiento individual con TOA en la línea U937, genera una disminución inicial de GSH a las 6hs, que a las 24hs se transforma en un aumento significativo. En el caso de la combinatoria TOA+MG132, si bien se observa una

disminución significativa a 6hs, el aumento posterior es de menor magnitud que el generado por TOA sólo y no supera los niveles basales (Fig. 3.22A, panel superior). Vale la pena recordar que, como se mostró anteriormente, esta combinatoria no indujo niveles significativos de O_2^- (Fig. 3.19A, panel superior) y resultó sinérgica en cuanto al efecto citotóxico (Fig. 3.7A).

En el caso de los tratamientos CAPE y TOA+CAPE en U937, se observa que desde las 6hs de tratamiento se genera un aumento significativo del nivel de GSH y que este permanece elevado transcurridas las 24hs (Fig. 3.22B, panel superior). Es necesario señalar que ambos tratamientos inducen la producción de altos niveles de O_2^- tanto a 6 como a 24hs según se mostró anteriormente (Fig. 3.19B, panel superior) y que la combinatoria TOA+CAPE mostró un comportamiento antagónico en cuanto a la inducción de muerte celular (Fig. 3.7B).

Con respecto a la línea Raji, puede observarse que con excepción de MG132, el resto de los tratamientos, ya sean individuales (TOA y CAPE) o combinados (TOA+MG132 y TOA+CAPE) generan una disminución significativa del nivel de GSH intracelular a 6hs que sigue persistiendo a las 24hs de tratamiento (Fig. 3.22A y B, paneles inferiores). Vale la pena recordar que todos estos tratamientos generaron niveles de O_2^- significativamente mayores al basal (Fig. 3.19A y B, paneles inferiores). Además, se hace necesario destacar que tanto TOA+MG132 como TOA+CAPE mostraron antagonismo en la línea Raji (Fig. 3.7C y D).

Esta serie de resultados indica que, en el caso de la línea Raji, aquellos tratamientos capaces de inducir altos niveles de O_2^- generan en todos los casos una disminución de GSH sin que se registre un aumento posterior a modo de respuesta por parte de la célula.

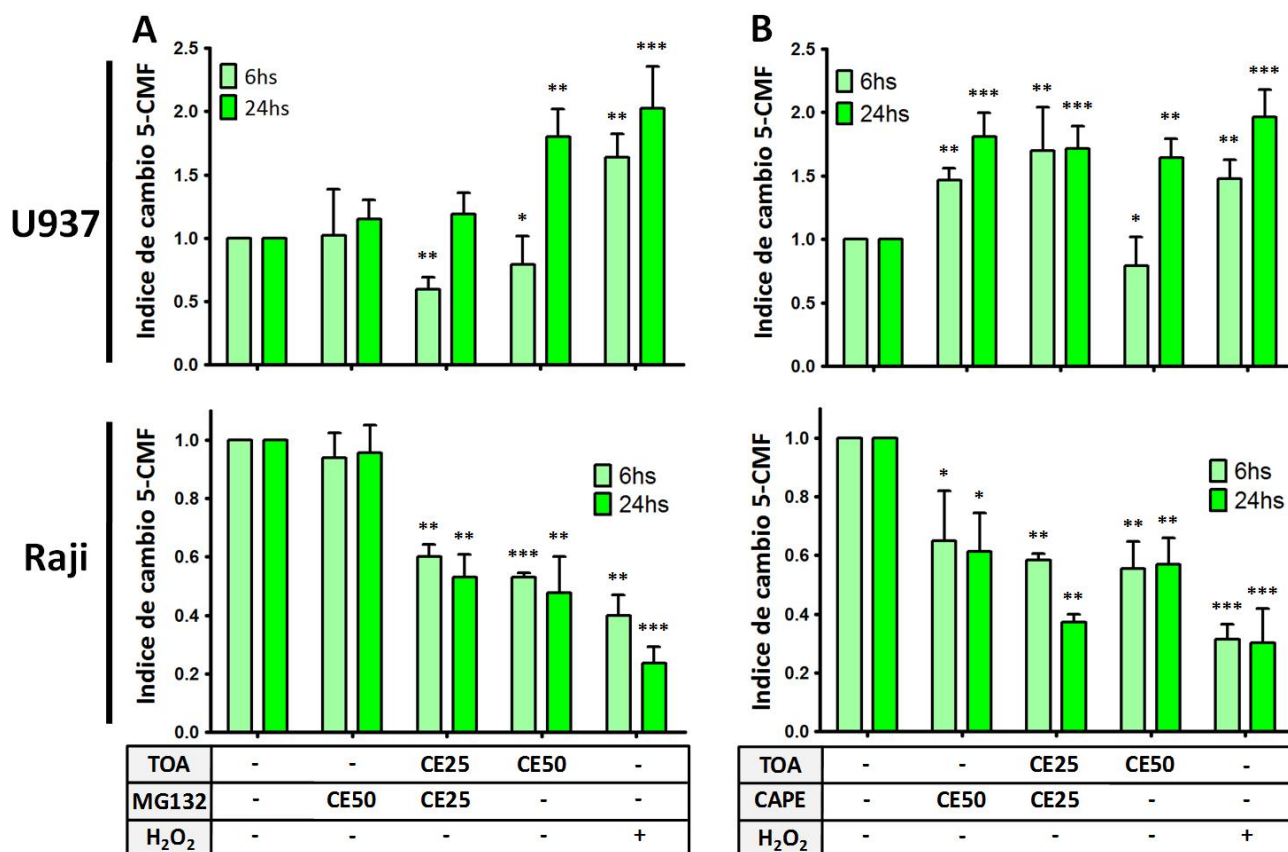


Figura 3.22. Resumen de los cambios en los niveles de GSH inducidos por TOA, MG132 y CAPE.

Gráficos de barras que muestran el índice de cambio de fluorescencia de 5-CMF con respecto al basal a 6 y 24hs de tratamiento individual o combinado entre TOA y MG132 (A) y TOA y CAPE (B). El índice de cambio (IC) se calculó como: mediana de fluorescencia de 5-CMF inducida por el tratamiento/mediana de fluorescencia de 5-CMF del basal, a partir de los datos obtenidos de tres o más experimentos independientes en cada caso. Control positivo; H₂O₂ 0.5mM. La presencia de diferencias significativas con respecto al basal se evaluó mediante el Test de Kruskal-Wallis, seguida de un Post-Test de Dunn. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Los valores de CE correspondientes a cada tratamiento se encuentran explicitados en la Tabla 3.1.

Otra es la situación que se presenta en el caso de la línea U937 en donde una mayor producción de O₂⁻, como ocurre en el caso de TOA+CAPE, genera una respuesta celular que tiende hacia el aumento de los niveles intracelulares de GSH y esto se asocia a una menor efectividad en cuanto a su capacidad de inducir muerte (antagonismo). Por el contrario, aquellos tratamientos incapaces de causar el aumento significativo de O₂⁻ en esta línea, no generan el aumento de GSH y esto parece asociarse a un aumento de potencia citotóxica, como ocurre en el caso de TOA+MG132 que presenta un comportamiento sinérgico.

3.2.4 El sinergismo TOA+MG132 en la línea U937 se asocia a bajos niveles de $O_2^{\cdot-}$

Con el objetivo de confirmar la asociación planteada anteriormente entre la generación de altos niveles de $O_2^{\cdot-}$ y antagonismo, nos propusimos evaluar la respuesta de las células U937 a la combinatoria TOA+MG132 en presencia de un agente capaz de generar de $O_2^{\cdot-}$ pero incapaz de inducir muerte celular por sí solo. Buscamos comprobar entonces, si el nivel elevado de $O_2^{\cdot-}$ tendría o no un efecto en la interacción sinérgica de TOA y MG132 demostrada en células U937.

Un compuesto que cumple con estas características es el H_2O_2 , del cual se sabe que, al ser agregado de manera exógena a las células, es capaz de generar un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ intracelulares debido al daño oxidativo que ejerce sobre distintas estructuras celulares incluida la mitocondria (Carter *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2009). Sin embargo, este compuesto también es capaz de generar citotoxicidad dependiendo de la concentración a la cual se utilice.

A fin de determinar una concentración de H_2O_2 capaz de generar $O_2^{\cdot-}$ sin inducir citotoxicidad en la línea U937, calculamos la ecuación de efecto medio para H_2O_2 en esta línea utilizando la doble marcación FDA/IP por citometría de flujo. A partir de la curva dosis respuesta obtenida determinamos la concentración sub-citotóxica (CE01) que resultó ser $80\mu M$ (Fig. 3.23A y B). Una vez hecho esto, evaluamos la capacidad del H_2O_2 de generar $O_2^{\cdot-}$ a esa concentración en células U937, verificándose un incremento significativo en los niveles de esta especie con respecto al basal tanto a 6hs como a 24hs (Fig. 3.23C y D).

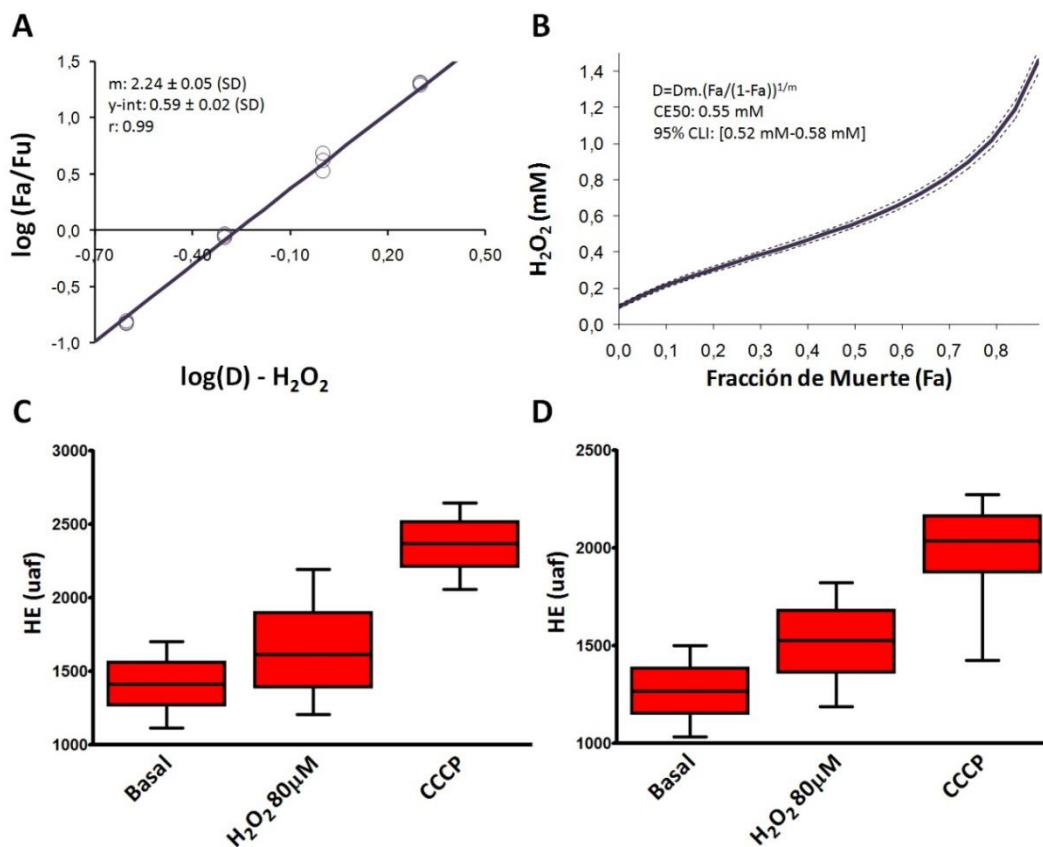


Figura 3.23. Cálculo de CE01 de H₂O₂ y evaluación de la producción de O₂⁻. Recta de regresión correspondiente a la ecuación de efecto medio de H₂O₂ en la línea U937 (A) y curva de predicción de efecto (B). Se muestran los parámetros obtenidos para calcular la dosis sub-letal (CE01). Se muestra además los Diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia de HE obtenidos por tratamiento con CE01 de H₂O₂ a 6hs (C) y 24hs (D) La escala de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). Control positivo: CCCP 50µM.

Posteriormente, procedimos a evaluar el efecto sobre la producción de O₂⁻ y los niveles de GSH de la combinatoria TOA+MG132 en presencia y ausencia de la CE01 de H₂O₂. En los ensayos con HE se pudo observar que tanto a 6hs como a 24hs la presencia de H₂O₂ sub-letal generó un aumento en la producción de O₂⁻ con respecto al tratamiento con la combinatoria TOA+MG132 en ausencia de H₂O₂ (Fig. 3.24A), tanto fue así que el análisis estadístico develó la presencia de un aumento significativo de la fluorescencia de HE con respecto al basal para el tratamiento en presencia de H₂O₂ (Fig. 3.24C). En cuanto a la marcación con 5-CMF el tratamiento combinado en presencia de H₂O₂ produjo un aumento en los niveles de GSH con respecto al tratamiento con TOA+MG132 solo (Fig. 3.24B). De esta manera, la reducción significativa de señal que se observaba a 6hs para TOA+MG132 con respecto al basal, no se observó en presencia de H₂O₂ 80µM. Del mismo modo, luego de 24hs de tratamiento, la presencia de H₂O₂ junto con la

combinatoria generó un aumento significativo del nivel de GSH con respecto al basal, lo que no se produjo al tratar solamente con TOA+MG132 (Fig. 3.24D).

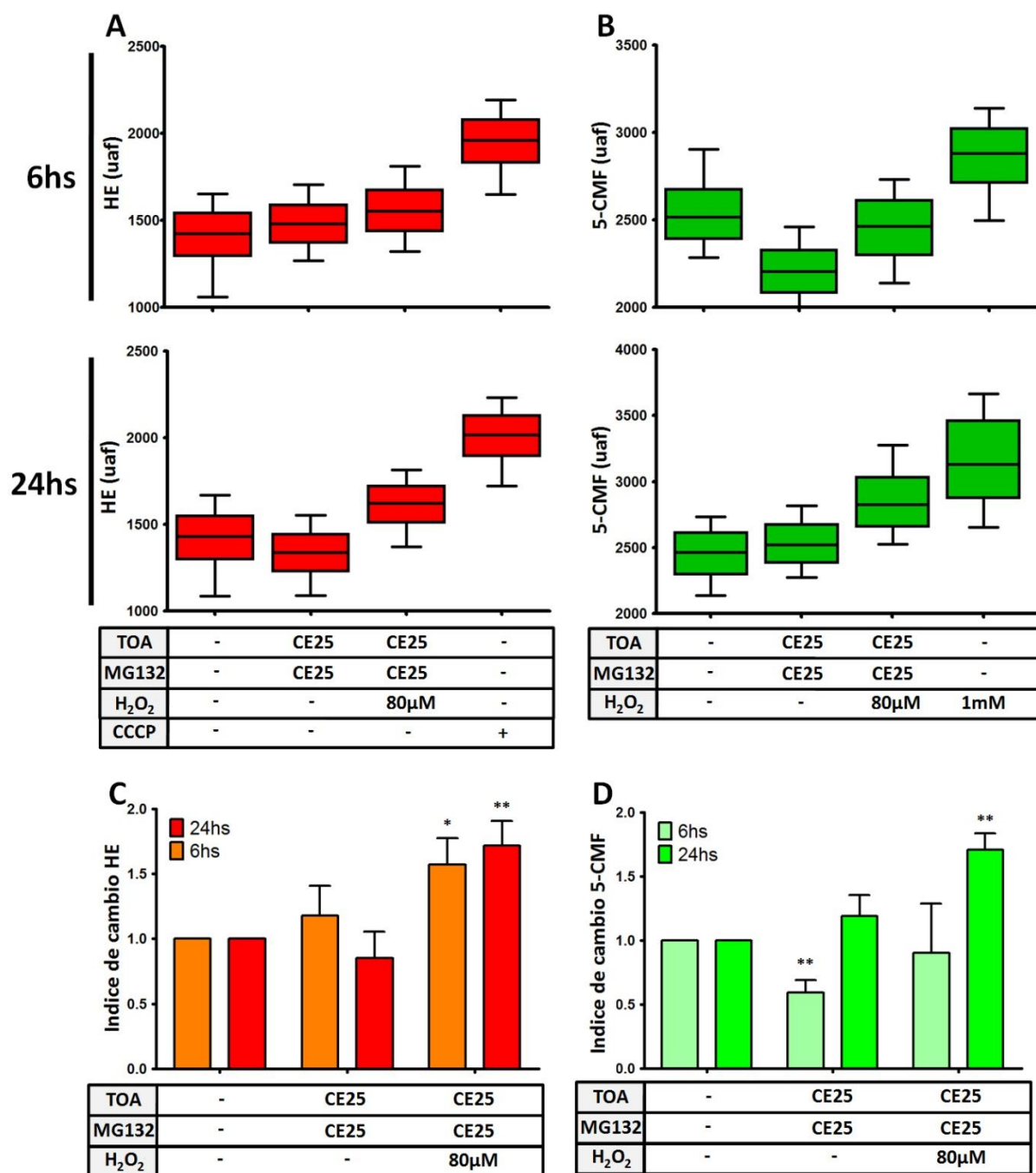


Figura 3.24. Cambios en la respuesta a TOA+MG132 por agregado de H₂O₂ sub-letal. Diagramas de Box-Whisker de distribución de fluorescencia obtenidos mediante marcación con HE (A) y 5-CMF (B) para el tratamiento con TOA+MG132 en presencia de H₂O₂. Los gráficos corresponden a un experimento representativo de todos los realizados. A partir de los datos obtenidos se construyeron gráficos de barras representando el índice de cambio con respecto al basal de HE (C) y 5-CMF (D) a 6hs y 24hs de tratamiento.

La presencia de diferencias significativas con respecto al basal se evaluó mediante el test de Kruskal-Wallis, seguido de un Post-Test de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Por último, se repitió el ensayo de citotoxicidad con la combinación TOA+MG132 en presencia de H_2O_2 80 μ M. En estas nuevas condiciones, la combinatoria mostró antagonismo en cuanto al efecto citotóxico (Fig. 3.25) a diferencia de lo observado anteriormente en ausencia de H_2O_2 , en donde la combinatoria mostraba un comportamiento de tipo sinérgico en todo el rango de efecto (Fig. 3.13A). Este cambio de comportamiento en cuanto al tipo de interacción observada en presencia de altos niveles de $O_2^{\cdot -}$ refuerza la idea de que el sinergismo observado en U937 con TOA+MG132, depende de la baja capacidad de este tratamiento para generar anión superóxido.

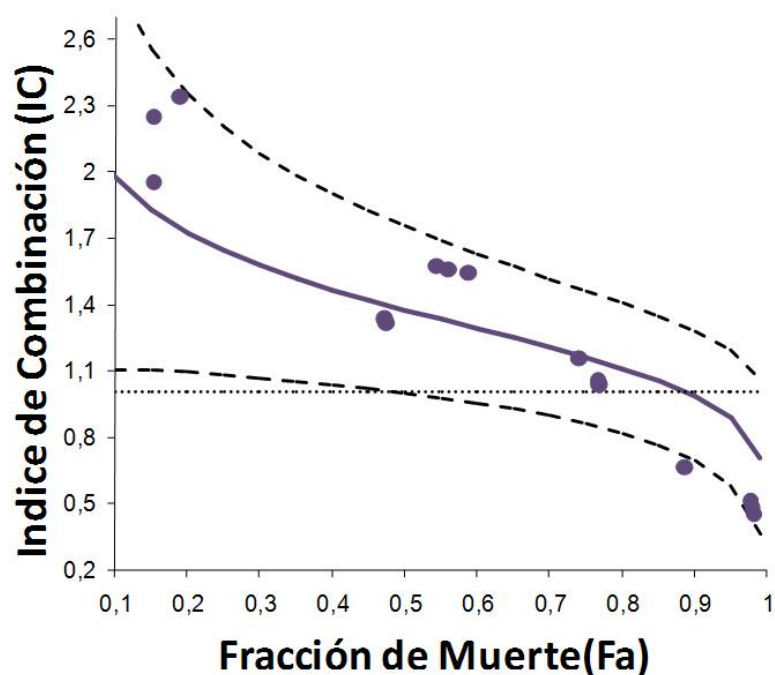


Figura 3.25. Cálculo del Índice de Combinación (CI) en cuanto al efecto citotóxico de TOA+MG132 en presencia de H_2O_2 sub-lethal. Se muestra el CI calculado para todo el rango de efecto citotóxico (líneas continuas) con límites superiores e inferiores correspondientes a un IC95% (líneas discontinuas). Estas curvas se calcularon a partir de los CI obtenidos para los datos experimentales (círculos). $CI > 1$ antagonismo, $CI < 1$ sinergismo, $CI = 1$ aditividad (líneas punteadas)

3.3 Expresión de BNIP3 y su relación con el efecto citotóxico inducido por TOA+MG132

3.3.1 Expresión diferencial de la proteína BNIP3 en células U937 y Raji

A partir de los resultados presentados en los Bloques I y II se logró demostrar que la combinatoria TOA+MG132 actúa de manera diferenciada sobre las dos líneas celulares en estudio, siendo esta combinatoria sinérgica en la línea U937 y antagónica en la línea Raji. Además, fue posible identificar a la producción de O_2^- y la modulación de los niveles de GSH como variables que influyen el comportamiento de dicha combinatoria en la línea U937. Sin embargo, hasta este punto no hemos podido explicar la presencia de antagonismo para el tratamiento TOA+MG132 en la línea Raji, ni el comportamiento diferencial de esta combinación de drogas sobre los dos modelos celulares en estudio. En particular, hasta el momento no ha sido posible encontrar ninguna asociación entre la producción de O_2^- y los niveles elevados de glutatión con el antagonismo observado entre TOA y MG132 en la línea Raji.

Con el propósito de esclarecer aunque sea en parte estas incógnitas nos propusimos explorar otros mecanismos que permitan explicar los fenómenos observados. Un posible mecanismo que podría ayudar a explicar las diferencias observadas en cuanto al tipo de interacción de la combinatoria en ambas líneas, está relacionado con el nivel de expresión de la proteína BNIP3. Se ha propuesto que dicha proteína juega un papel importante en la muerte mediada por TOA ([Kanzawa et al., 2005](#)). Por otra parte, se ha reportado en diversos modelos tumorales que el silenciamiento epigenético u otras alteraciones de la expresión de BNIP3 pueden actuar como mecanismo de resistencia a la muerte inducida por diversos quimioterápicos ([Erkan et al., 2005](#); [Murai et al., 2005b](#); [Okami et al., 2004](#)) y a la muerte por hipoxia ([Azad et al., 2008](#)). Por último existen evidencias de que la línea Raji tiene silenciado el gen de BNIP3, lo que en una primera instancia explicaría su resistencia al TOA y a la combinatoria TOA+MG132 ([Murai et al., 2005a](#)).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos en primer lugar estudiar las características de la expresión de BNIP3 en las líneas celulares a nivel de ARN mensajero (ARNm) y proteína. Mediante ensayos de RT-PCR nos fue posible detectar la expresión basal del mensajero de BNIP3 en la línea U937 ([Fig. 3.26A](#)). Cuando tratamos estas células con las CE que producen la muerte celular a 72hs y evaluamos la expresión relativa del ARNm de BNIP3 a 24hs, observamos un incremento en

el caso del tratamiento con MG132 y una pequeña disminución en el caso de TOA y TOA+ MG132 con respecto al basal (Fig. 3.26).

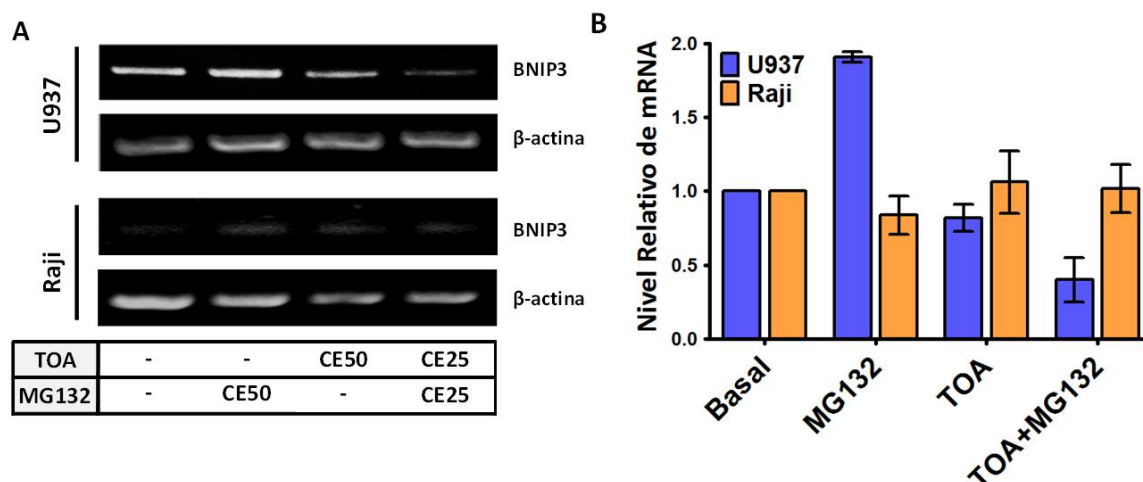
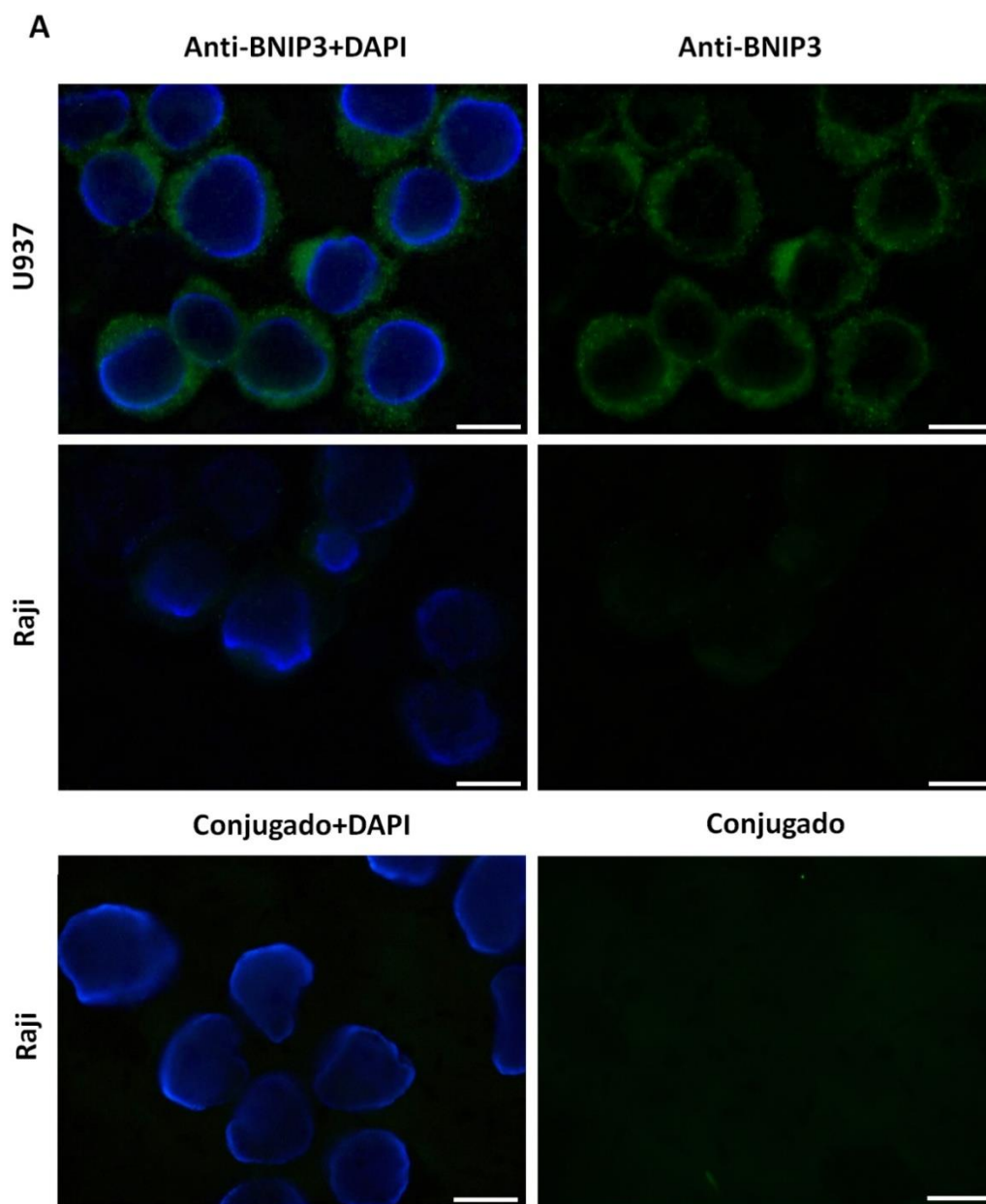


Figura 3.26. Expresión diferencial del mRNA de BNIP3 evaluada por RT-PCR. Análisis de la expresión relativa del producto de 317pb en células U937 y Raji tratadas y en condición basal (A). Los valores correspondientes de las CE en μM son los mismos que se utilizaron en los ensayos previos. Se utilizó como control de ADNc β -actina. Los gráficos de barra indican los valores correspondientes obtenidos por densitometría (B).

Por el contrario, en la línea Raji en condiciones basales el ARNm de BNIP3 fue apenas detectable, en coincidencia con lo reportado por otros autores (Fig. 3.26A) y no se observaron cambios en los niveles del mensajero con respecto al basal luego de 24hs de tratamiento con TOA, MG132 o TOA+MG132 (Fig. 3.26). Posteriormente a la detección del mensajero de BNIP3 se procedió a la búsqueda de la proteína mediante ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico. La proteína fue fácilmente detectable en la línea U937 mostrando una distribución homogénea por todo el citoplasma (Fig. 3.27A). Por el contrario, su detección fue dificultosa en la línea Raji ya que la intensidad de fluorescencia específica para BNIP3 prácticamente no se diferenció con respecto a la observada en el caso del control negativo (Ac. secundario conjugado con FITC) (Fig. 3.27A). Una situación similar se observó al realizar ensayos de Western Blott, en donde se detectó fácilmente BNIP3 en U937 en sus formas mono y dimérica. Por el contrario, en el caso de la línea Raji la expresión de esta proteína en forma dimérica fue muy baja, mientras que la presencia del monómero es prácticamente indetectable (Fig. 3.27B).



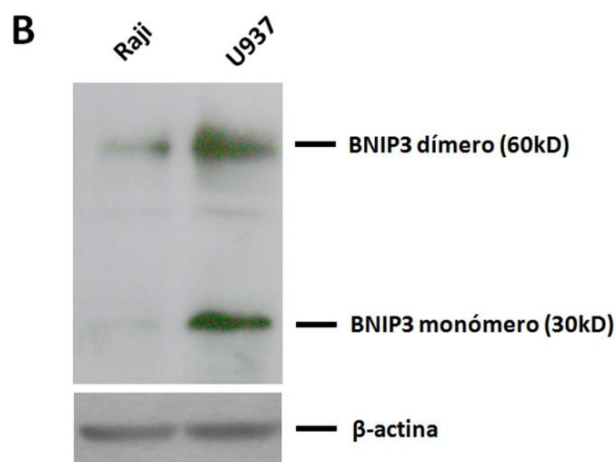


Figura 3.27. Expresión diferencial de la proteína BNIP3 evaluada por IFI y WB. Detección de la expresión basal de BNIP3 en ambas líneas celulares por inmunofluorescencia utilizando un Ac. primario anti-BNIP3 y un Ac. secundario conjugado con FITC (A). La columna en la que se indica Anti-BNIP3+DAPI muestra una superposición digital de la imagen de fluorescencia verde (anti-BNIP3) con la imagen de fluorescencia azul (tinción nuclear con DAPI) obtenida en el mismo campo, para apreciar la distribución relativa de BNIP3 en el citoplasma y aéreas perinucleares. También se muestra la fluorescencia inespecífica detectada en preparados de células Raji con el conjugado FITC en ausencia de anticuerpo primario anti-BNIP3. Barra de tamaño= 10 μm . En (B) se muestra un ensayo de WB para BNIP3 utilizando extractos citoplasmáticos de la línea Raji (izquierda) y U937 (derecha) en condiciones basales.

3.3.2 Aumento de la expresión de mensajero de BNIP3 en las células Raji por tratamiento con Ácido Valproico (VPA)

Como ya se mencionó anteriormente, existen evidencias de que las células tumorales pueden en determinados casos disminuir la expresión de BNIP3 mediante silenciamiento epigenético (Murai *et al.*, 2005a). Esto podría evitar la muerte de las células tumorales en condiciones adversas como la hipoxia o la exposición a TOA u otras drogas citotóxicas (Ishida *et al.*, 2007; Mazure *et al.*, 2009; Okami *et al.*, 2004). Este silenciamiento se basa fundamentalmente en la alteración de los patrones acetilación de histonas y/o de metilación del ADN codificante para el gen en cuestión (Heller *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta estos conocimientos previos, nos propusimos inducir un aumento en la expresión de BNIP3 en la línea Raji, mediante el uso de agentes con probada acción epigenética.

Esto se hizo con el objetivo último de evaluar la influencia del silenciamiento de BNIP3 sobre la respuesta de las células Raji al tratamiento combinado TOA+MG132. Se utilizaron para estos ensayos dos compuestos: 5-Azacidina (5-AZA), que posee acción hipometilante y Ácido Valproico, un inhibidor de histona-desacetilasa (HDAC). Nuevamente, el nivel relativo de expresión del mensajero se evaluó mediante RT-PCR luego de 24hs de tratamiento.

Al tratar las células Raji con VPA en concentraciones 2, 3 y 4 mM se observó un claro aumento del nivel de ARNm de BNIP3 con respecto al basal ([Fig. 3.28A](#)). Lo mismo ocurrió en el caso de 5-AZA 1 μ M, la cual mostró un efecto similar al de VPA en cuanto a la capacidad de incrementar el ARNm de BNIP3 en Raji ([Fig. 3.28C](#)). Vale la pena destacar que VPA también generó un incremento del nivel del mensajero de BNIP3 en la línea U937 al utilizar el mismo rango de concentraciones ([Fig. 3.28A](#)).

Las células Raji tratadas con 3mM de VPA por 24hs junto con MG132 CE30, CE40 y CE50 mostraron también un aumento del ARNm de BNIP3 ([Fig. 3.28B](#)) contrariamente a lo observado anteriormente en ausencia de VPA ([Fig. 3.26A](#)). Habiendo obtenido resultados similares con ambas drogas epigenéticas y por cuestiones inherentes a la facilidad de manejo y almacenamiento de las mismas, decidimos seguir trabajando sólo con VPA.

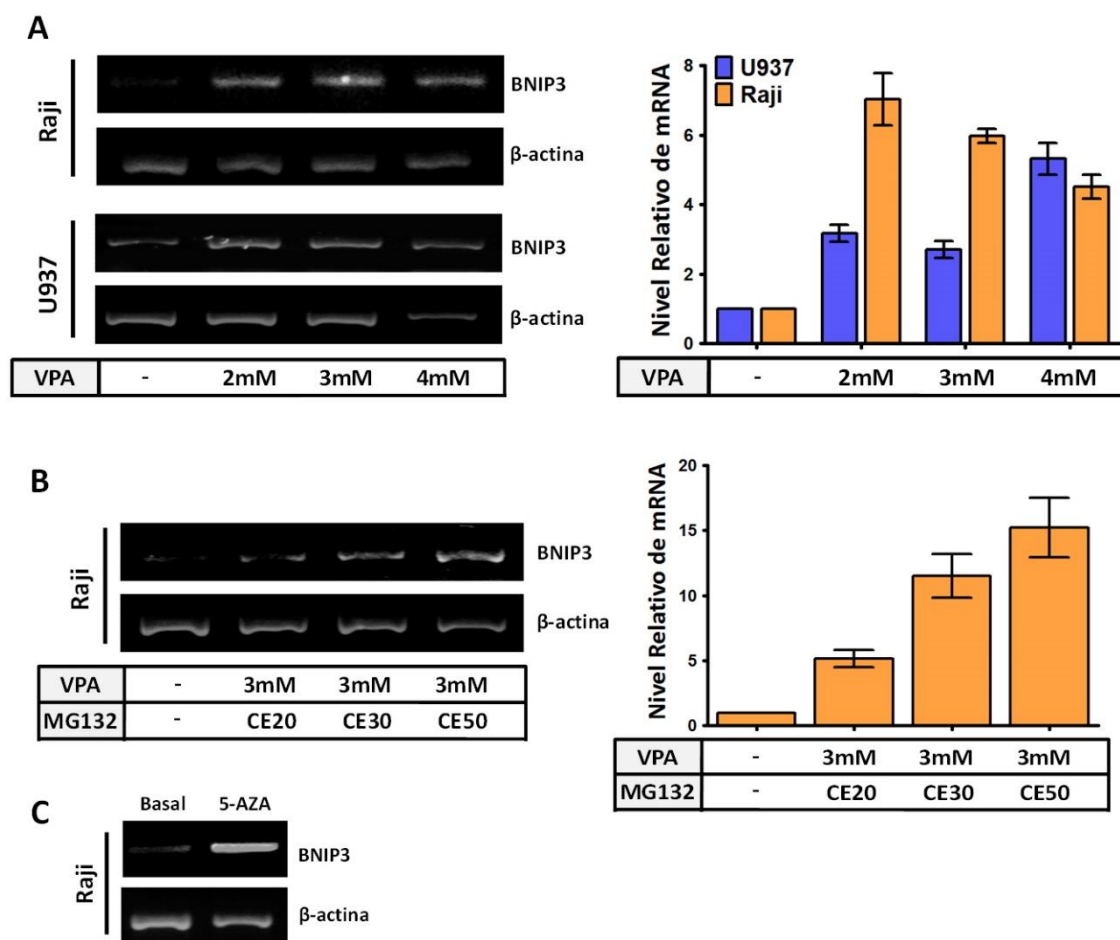


Figura 3.28. Expresión del mRNA de BNIP3 evaluada por RT-PCR en presencia de VPA y 5-AZA. Ensayos de RT-PCR del producto de 317pb en células U937 y Raji tratadas VPA y en condición basal (A), células Raji Tratadas con VPA+MG132 (B) y células Raji tratadas con 5-AZA (C). Se utilizó como control de cADN β -actina. Los gráficos de barra indican los valores correspondientes obtenidos por densitometría.

3.3.3 Aumento de la expresión de la proteína BNIP3 en células Raji luego del tratamiento con VPA

Al momento de analizar el efecto del VPA 3mM sobre la expresión de la proteína BNIP3 mediante inmunofluorescencia, las células Raji tratadas mostraron un aumento en la expresión de BNIP3 con respecto a las no tratadas (Fig. 3.29A). Además, se observó que esta proteína se encontraba distribuida de manera desigual en el citoplasma celular, en áreas cercanas al núcleo y alejada de la periferia. Lo contrario se observó en el caso de las células U937 tratadas con VPA, en donde la

distribución de la proteína fue uniforme en toda el área celular (Fig. 3.29B). El incremento en la expresión de BNIP3 en la línea Raji fue posteriormente confirmado mediante Western Blot (Fig. 3.29C).

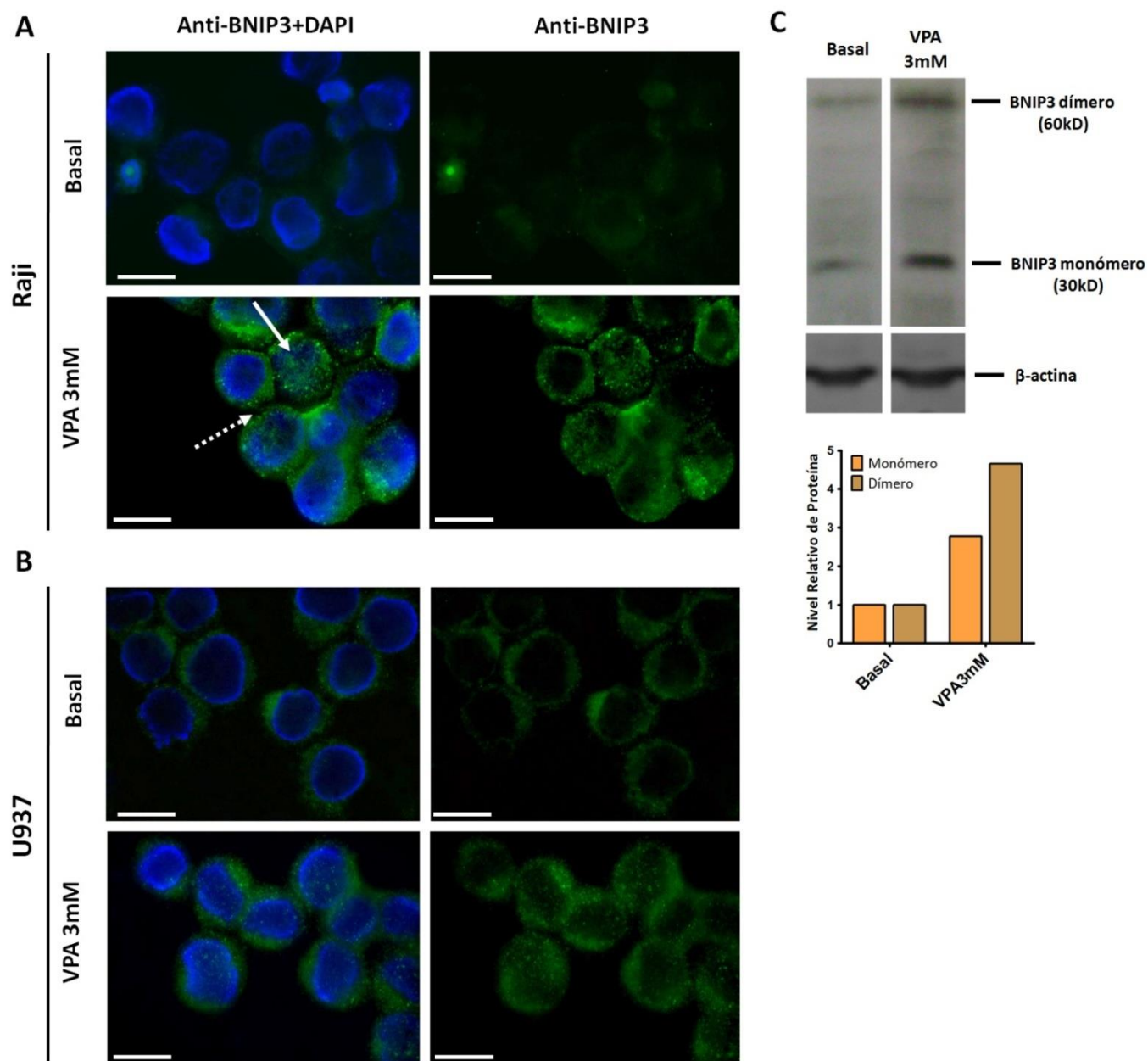


Figura 3.29. Expresión de la proteína BNIP3 en células tratadas con VPA 3mM. Detección de la expresión basal de BNIP3 en ambas líneas celulares por inmunofluorescencia utilizando un Ac. primario anti-

BNIP3 y un Ac. secundario conjugado con FITC. La superposición digital con imágenes de fluorescencia para DAPI muestra la distribución intracelular de BNIP3 en las células tratadas con VPA 3mM. En células Raji (A) se observó en general una ubicación de la marca fluorescente en áreas perinucleares (flecha blanca), mientras que en áreas marginales se observó poca o nula fluorescencia (flecha punteada). La línea U937 (B) tratada con VPA siguió mostrando una distribución uniforme en todo el citoplasma. Barra de tamaño= 10 μ m. Ensayo de Western blot que confirma un incremento en la expresión del dímero de 60kDa y el monómero de 30 kDa de BNIP3 en células Raji tratadas con VPA (C). El gráfico de barras corresponde al análisis densitométrico de las bandas observadas.

3.3.4 VPA no sensibiliza la línea Raji a la acción citotóxica de TOA+MG132

Como ya dijimos, nuestra intención fue utilizar el VPA como un agente sensibilizante sobre la línea Raji sin que este contribuya por sí mismo a la citotoxicidad, sino que su acción se limite a generar un aumento en los niveles de BNIP3. De esta manera, esperábamos generar una potenciación del efecto citotóxico de la combinación TOA+MG132 sobre estas células, como consecuencia de la expresión de BNIP3.

En primer lugar, se realizaron ensayos de citotoxicidad de VPA a 72hs (mediante citometría de flujo con FDA/IP) para obtener los parámetros de una ecuación de efecto medio, obteniendo entonces una curva o función dosis vs. efecto citotóxico. A partir de los datos obtenidos se calcularon las CE50 de VPA a 72hs, que resultaron ser 6.22mM y 4.20mM para Raji y U937 respectivamente. Además se calculó la concentración sub-citotóxica de VPA en Raji que resultó ser 3mM (datos no mostrados).

La idea de utilizar una concentración de VPA sub-citotóxica como agente sensibilizante surgió a partir de los ensayos mostrados anteriormente en donde se demostró que en U937 la combinatoria TOA+MG132 resultó sinérgica y que en esta línea celular BNIP3 se expresa de manera constitutiva. En base a estos antecedentes, anticipábamos que el desilenciamiento epigenético de BNIP3 en células Raji podría potenciar el efecto de TOA y MG132, logrando que la combinación TOA+MG132 pase de antagónica a sinérgica.

Nuestra primera hipótesis suponía que concentraciones sub-citotóxicas de VPA actuarían a nivel epigenético aumentando los niveles de expresión de BNIP3, para generar así un sinergismo entre TOA y MG132 en cuanto al efecto citotóxico, como el observado en el caso de la línea U937 (Fig. 3.7A).

Sin embargo, esta hipótesis probó ser incorrecta en este caso, ya que al realizar el ensayo de citotoxicidad con la combinación TOA+MG132 en presencia de VPA 3mM, la interacción entre TOA

y MG132 seguía comportándose de manera antagónica en todo el rango de efecto citotóxico (Fig. 3.30B y C).

De hecho, el antagonismo se vio incrementado, ya que se pasó de una cota inferior para el índice de combinación (CI mínimo) de 1.16 obtenido para la CE80 en ausencia de VPA (Fig. 3.30A), a un CI mínimo de 1.91 obtenido para la CE70 en presencia de VPA sub-letal (Fig. 3.30A).

Además, al combinar TOA+VPA a una relación molar fija, se observó que esta nueva combinación actuaba de manera sinérgica en la línea U937 (Fig. 3.31A panel izquierdo), mientras que en la línea Raji generó un efecto sumamente antagónico ya que el efecto citotóxico del TOA en esta línea prácticamente desapareció en presencia de VPA (Fig. 3.31A panel derecho).

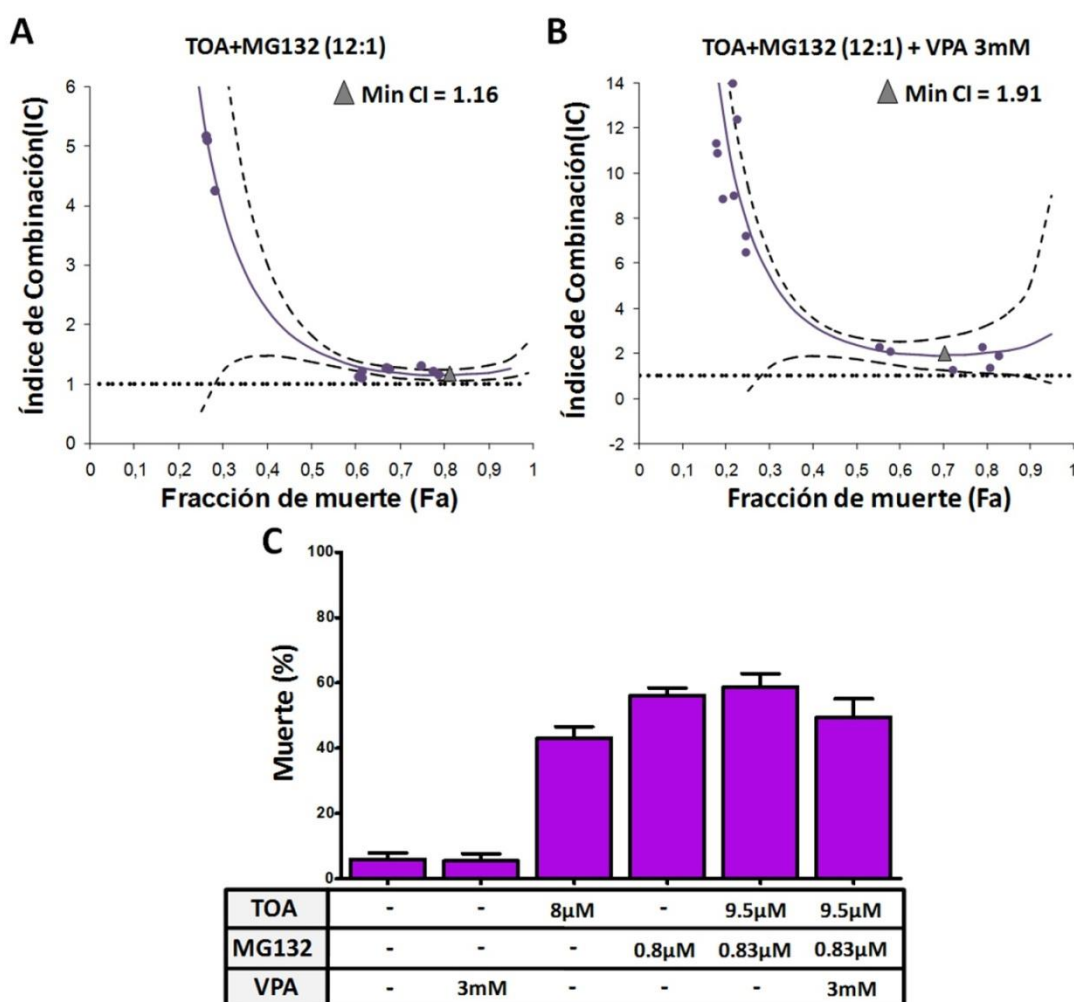


Figura 3.30. Influencia de VPA sobre el efecto citotóxico de TOA+MG132. Gráfico de CI en función del nivel de efecto citotóxico correspondiente a células Raji tratadas con TOA+MG132 en ausencia (A) y presencia (B) de VPA 3mM. Se muestran en cada caso los datos experimentales (puntos) y la curva calculada a partir de los mismos (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (líneas guionadas). En (C) se muestran algunos de los valores de citotoxicidad obtenidos experimentalmente para los tratamientos individuales y combinados.

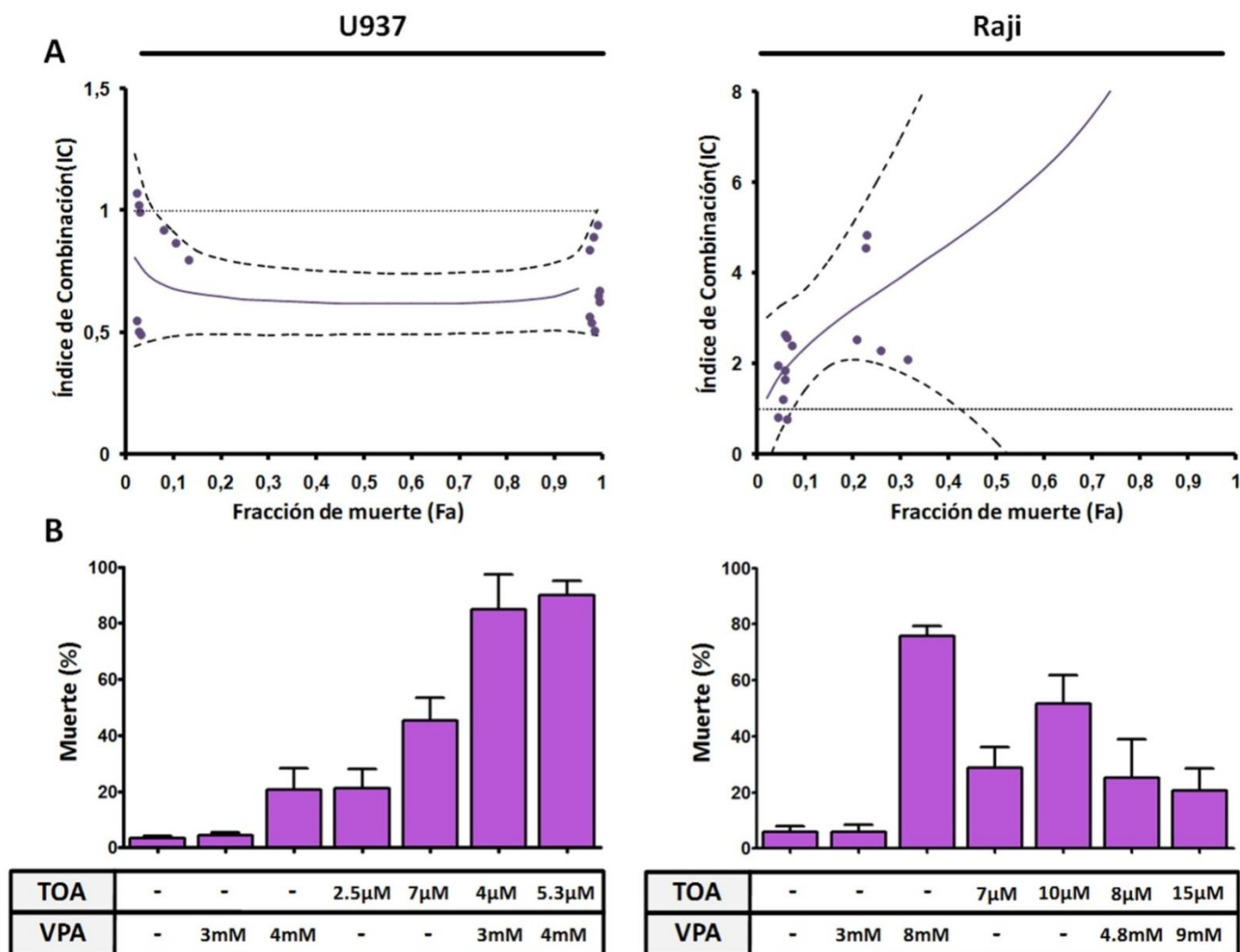


Figura 3.31. Interacción de TOA y VPA sobre el efecto citotóxico en las líneas Raji y U937. Gráficos de CI en función del nivel de efecto citotóxico (A) correspondiente a células U937 (panel izquierdo) y Raji (panel derecho) tratadas con TOA+VPA. Se muestran en cada caso los datos experimentales (puntos) y la curva

calculada a partir de los mismos (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (líneas guionadas). En (B) se muestran algunos de los valores de citotoxicidad obtenidos experimentalmente para los tratamientos individuales y combinados en cada línea, y que fueron utilizados para obtener el CI.

Esta serie de resultados nos indica que, aunque está reportado que BNIP3 es un factor importante en el mecanismo de acción de TOA, no alcanza solamente con aumentar la expresión de esta proteína para lograr sensibilizar a la línea Raji a los efectos de TOA+MG132. Este hecho probablemente se deba a la presencia de otros mecanismos de resistencia que la célula tumoral pone en juego para resistir el efecto citotóxico ejercido por la combinatoria.

3.4 Inducción de autofagia por TOA y MG132 en las células Raji y U937

3.4.1 Autofagia basal en las células Raji y U937

Como se comentó en la sección de Introducción, existen varios reportes que indican la capacidad de TOA de inducir autofagia en diversos modelos tumorales. Sin embargo, las consecuencias de inducción de autofagia en células tumorales ha sido motivo de controversia. Para algunos autores la inducción de autofagia por el TOA actuaría como un mecanismo iniciador de muerte celular ([Kanzawa et al., 2005](#)), mientras que para otros la ocurrencia de autofagia constituye un mecanismo de resistencia. Esta última interpretación es actualmente la más difundida, y entiende a la autofagia como una respuesta de stress celular frente a la injuria que representan el TOA u otras drogas citotóxicas ([Bellot et al., 2009](#); [Quinsay et al., 2010](#); [Rikka et al., 2011](#)).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos investigar la presencia de autofagia y su posible rol en la resistencia a la citotoxicidad por TOA y MG132 en nuestro modelo de estudio. Más concretamente, buscamos determinar una posible relación entre la capacidad de TOA y MG132 de inducir autofagia y la potencia citotóxica que observamos en ambas líneas celulares.

En primer lugar evaluamos la presencia de autofagia basal en las líneas Raji y U937 y los cambios inducidos por los tratamientos TOA, MG132 y TOA+MG132 sobre este proceso. La proteína LC3 tiene un rol importante en la formación de autofagosomas. Al iniciarse la autofagia, LC3 es objeto de una modificación postraducciona en la que se conjuga con un grupo fosfatidil-etanolamina y así la proteína modificada pasa a llamarse LC3II, en tanto que la forma no conjugada se denomina LC3I. La forma LC3II se localiza de manera exclusiva en los autofagosomas, aún en sus formas más inmaduras. Como consecuencia de la conjugación de fosfatidil-etanolamina, LC3II tiene además una mayor movilidad electroforética y permite entonces que su detección sea utilizada como un indicador de la presencia de autofagosomas.

Mediante ensayos de Western Blot para la detección de la proteína LC3 en extractos celulares observamos la presencia de LC3II en ambas líneas celulares, sugiriendo la presencia de autofagosomas en estado basal ([Fig.32A](#)). Además, se observó un incremento en los niveles de LC3II luego de tratar la células por 24hs con TOA, MG132 y TOA+MG132, en concentraciones que previamente demostramos que resultan citotóxicas a 72hs([Fig. 3.32A y B](#)), indicando entonces que a 24hs se produce un incremento en la masa de autofagosomas con respecto a los basales.

Para complementar la identificación de autofagosomas, realizamos una marcación con la sonda fluorescente monodancyl-cadaverina (MDC) y observación por microscopía de fluorescencia. Esta sonda lipofílica tiene la propiedad de incorporarse a los autofagosomas tempranos y maduros, en tanto que su acumulación produce una emisión de fluorescencia en el rango azul-verde, cuando se excita con luz UV. Como toda sonda fluorescente lipofílica, el exceso de concentración puede marcar otras estructuras de manera inespecífica; es por ello que mediante la realización de ensayos preliminares optimizamos la concentración de MDC para el trabajo con las líneas Raji y U937.

Los autofagosomas identificados por MDC en ambas líneas celulares mostraron diferencias en cuanto al número, tamaño y distribución. La línea Raji mostró tener autofagosomas más grandes y con fluorescencia más intensa que la línea U937 ([Fig.32C](#)).

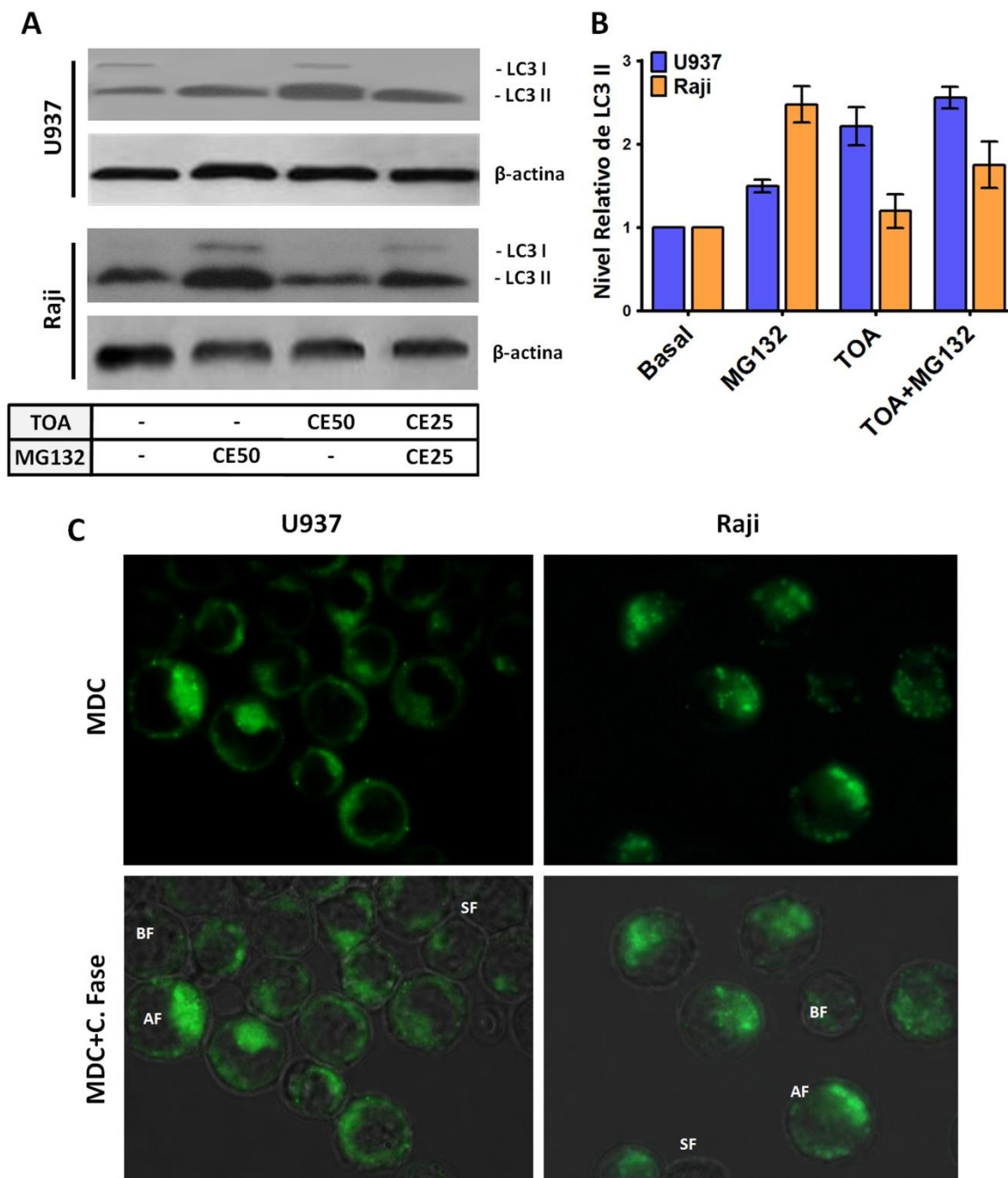


Figura 3.32. Autofagia basal e inducida por tratamientos en U937 y Raji. En (A) se muestra la imagen de un ensayo de WB para expresión de LC3I y LC3II en células sin tratamiento y tratadas por 24hs con TOA y MG132 solos y combinados con el correspondiente control de actina. Se muestran en (B) los resultados del análisis densitométrico de las bandas obtenidas en A. El panel (C) corresponde a imágenes de células Raji y U937 sin tratar marcadas con MDC. Algunas células mostraron puntos grandes con alta fluorescencia (AF), otras puntos pequeños con baja fluorescencia (BF) e incluso algunas células no presentaron fluorescencia

alguna (NF). MDC+C.Fase muestra una superposición digital de las imágenes de fluorescencia y contraste de fase para poder apreciar la distribución celular de los autofagosomas.

3.4.2 Cuantificación de autofagosomas mediante citometría de flujo utilizando MDC

Se hace necesario mencionar que en los ensayos de microscopía de fluorescencia realizados con MDC se observó que algunas células mostraban claramente la presencia de autofagosomas, mientras que en otras células de la misma muestra (e incluso dentro del mismo campo), estas vesículas estaban ausentes (Fig. 3.32C). La ocurrencia de este fenómeno se presentó como una dificultad para poder realizar una estimación fiel de las variaciones en el nivel de autofagosomas inducido por los tratamientos sobre las células, si pretendíamos utilizar cualquiera de los dos métodos mencionados. En otras palabras, utilizando la técnica de WB para LC3II, estaríamos estimando el nivel de autofagosomas mediante un promedio obtenido entre células con y sin autofagosomas. Por otro lado, si bien la microscopía permite discriminar entre células con y sin autofagosomas, su poder de cuantificación está limitado a la observación de unas pocas decenas de células, y además se hace complicada la estimación de diferencias en la intensidad de señal entre células positivas.

Por esta razón decidimos recurrir a un ensayo de citometría de flujo utilizando MDC, ya que mediante esta técnica es factible el análisis individual de miles de células por muestra y posibilitando discriminar la presencia, ausencia e intensidad de la marca fluorescente en cada uno de los eventos adquiridos.

Para utilizar la MDC como marcador de autofagosomas es necesario excitar esta molécula con luz UV y por eso utilizamos un citómetro especialmente equipado con este tipo de línea de iluminación. Como una ventaja adicional, al utilizar la citometría de flujo, la detección de la luz fluorescente emitida por MDC se realiza en un rango de longitudes de onda mucho más estrecho que en el caso de la microscopía de fluorescencia, aumentando sensiblemente la especificidad de la señal de MDC como marcadora de autofagosomas (Cavaliere *et al.*, 2014; Klionsky *et al.*, 2016a; Munafo *et al.*, 2001).

Para la puesta a punto de estos ensayos, decidimos en primer lugar comprobar la capacidad de la citometría de flujo de detectar cambios en los niveles de autofagia utilizando MDC. En este sentido, se realizó un ensayo tratando las células Raji por 24hs con diferentes dosis de Rapamicina. Este

compuesto, es capaz de inducir autofagia por inhibición de la vía mTOR y es utilizado como un estímulo pro-autofágico estándar (Klionsky *et al.*, 2016a). Junto a la tinción con MDC, cada muestra se marcó con FDA e IP para poder determinar cambios en la viabilidad celular además del nivel de autofagosomas (Fig.33A).

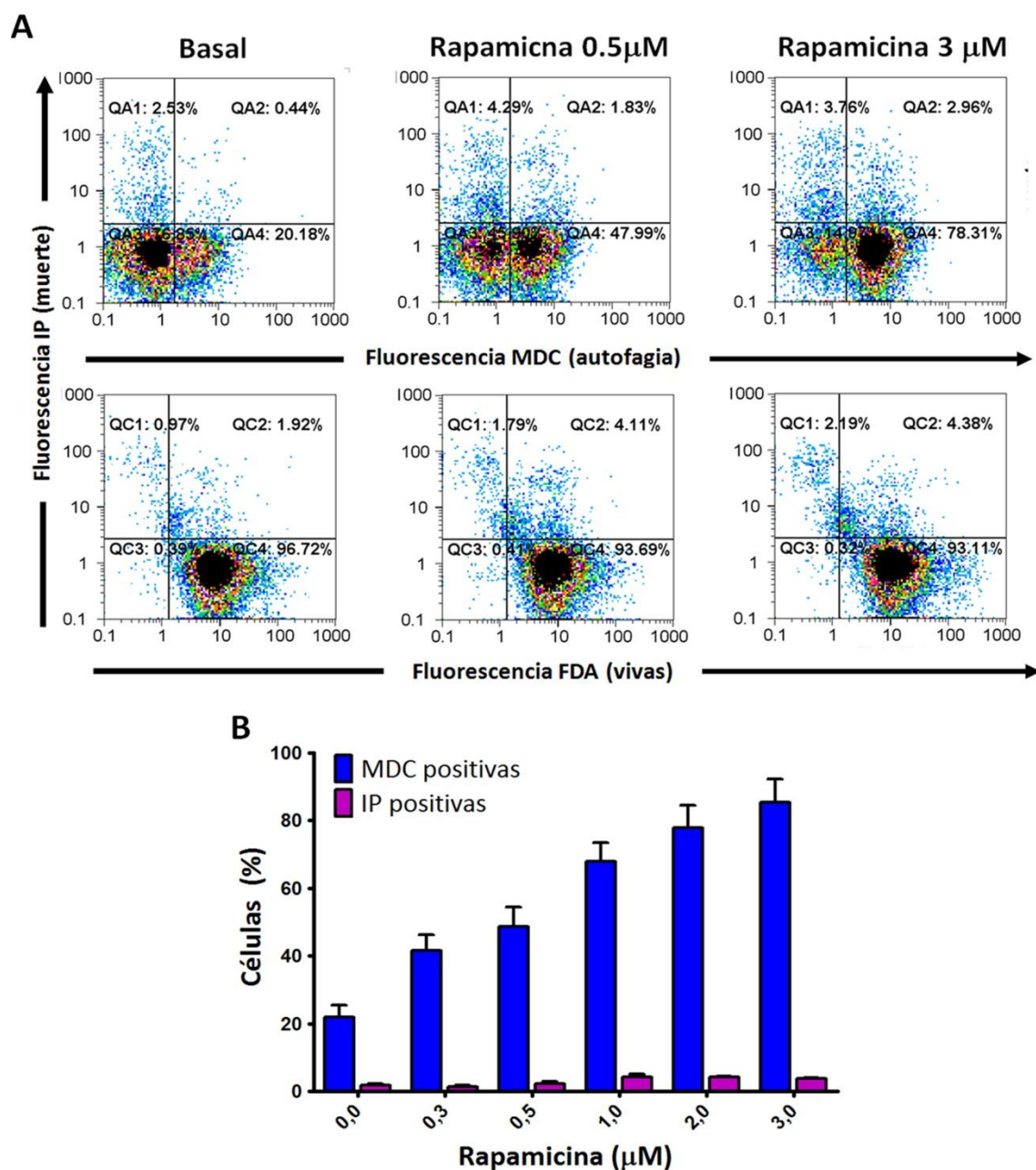


Figura 3.33. Determinación simultánea de autofagia y muerte celular por citometría de flujo en células tratadas con Rapamicina. Los gráficos tipo Dot-Plot en A corresponden a tres muestras representativas utilizadas para generar los gráficos de barras que se muestran en los paneles inferiores. El

análisis de cuadrantes de MDC vs IP (autofagia vs pérdida de permeabilidad de membrana) se muestra en la fila superior y el de FDA vs IP (actividad metabólica vs pérdida de permeabilidad de membrana) en la fila inferior. Los gráficos de barras en B muestran el porcentaje de células Raji viables (IP negativas), que resultaron positivas para MDC y el de células muertas (IP positivas) en presencia de dosis crecientes de Rapamicina luego de 24 hs de incubación. Las muestras fueron ensayadas por triplicado y las barras de error indican \pm SD alrededor de la media.

De esta manera confirmamos que era factible detectar el efecto inductor de autofagia de la Rapamicina por citometría de flujo. En este sentido, se observó un aumento dosis dependiente de la señal de MDC en células Raji luego de 24hs de tratamiento, indicando un mayor contenido de autofosomas. Además, no se registraron cambios importantes en la viabilidad celular con respecto al estado basal (Fig. 3.33B). Resultados similares se observaron para la línea U937 (datos no mostrados). Cuando se trató a la línea Raji por 72hs con concentraciones crecientes de TOA, se observó que solo las concentraciones menores a CE40 mantuvieron niveles de autofagia por encima del basal (Fig. 3.34A). Por otra parte, a dosis superiores a la CE30 se observó una relación inversa entre la dosis utilizada y el nivel de autofagia inducido. Esto significa que mientras mayor es el porcentaje de muerte que se induce, menor es la probabilidad de detectar autofagia en las células que permanecen viables. Resultados similares se obtuvieron para VPA en la línea Raji, en donde concentraciones que resultan subcitotóxicas (menores a 3mM) generaron un alto porcentaje de células MDC positivas a 72hs, mientras que para concentraciones capaces de inducir altos porcentajes de muerte, la cantidad de eventos positivos para MDC disminuyó drásticamente (Fig. 3.34B). En base a estos resultados adquiere gran importancia la posibilidad que brinda la citometría de flujo de medir autofagia exclusivamente en las células que permanecen vivas dentro de una muestra que posee un alto porcentaje de células muertas, a diferencia del WB para LC3II en donde este tipo de análisis no es posible.

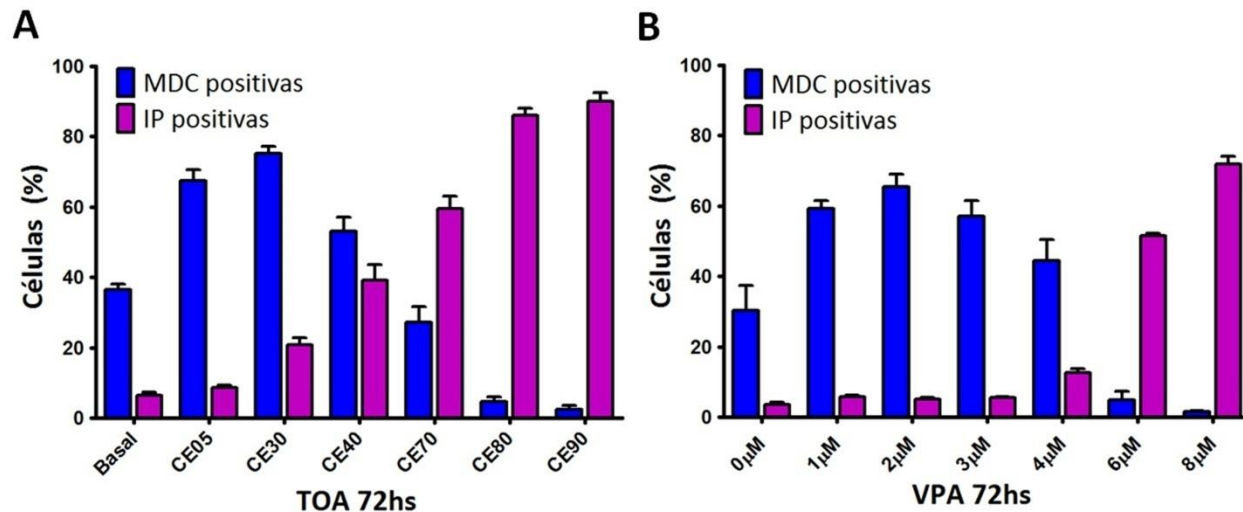


Figura 3.34. Evaluación simultánea de autofagia y muerte celular inducida por TOA y VPA en células Raji. Gráficos de barras mostrando el porcentaje de células Raji realizando autofagia (MDC positivas) y muerte celular (IP positivas) en presencia de concentraciones crecientes de TOA (A) y VPA (B) luego de 72hs de incubación. Las muestras fueron ensayadas por triplicado y las barras de error indican \pm SD alrededor de la media.

3.4.3 Determinación de flujo autofágico

Llegado este punto, es necesario destacar que la autofagia debe entenderse como un proceso dinámico, que se inicia con la formación de un fagóforo y culmina con la fusión de un autofagosoma maduro con el lisosoma. Es por esta característica dinámica de la autofagia que la cantidad de autofagosomas observados en un momento dado, no refleja necesariamente y de manera directa la ocurrencia e intensidad de la actividad degradativa autofágica. Es decir, la observación de un mayor número de autofagosomas o la detección de un incremento en los niveles de LC3II luego de un determinado estímulo, no indican necesariamente un efecto de inducción de autofagia, ya que esta situación puede darse tanto a partir de un aumento en la cantidad de sustrato que ingresa a esta vía de degradación (inducción de autofagia), como a un bloqueo de la eliminación de autofagosomas ya formados (bloqueo de flujo). En este último caso se daría la paradoja de observar un mayor número de autofagosomas, junto a la supresión de la degradación de la carga que es objeto de autofagia en tránsito hacia la unión con los lisosomas. En otras palabras, tanto en una condición de incremento del flujo autofágico como en presencia de un retraso del mismo sería posible observar un aumento en el número de autofagosomas.

Una estrategia adecuada para determinar si un tratamiento es verdaderamente un inductor de autofagia o no, es el estudio de la respuesta a dicho tratamiento en presencia de un bloqueante de las etapas tardías del proceso autofágico. Más precisamente, se sugiere no solo evaluar la respuesta del tratamiento en comparación con el basal, sino también la respuesta al tratamiento en presencia y ausencia de un bloqueante de flujo autofágico (Klionsky *et al.*, 2016a).

En este trabajo decidimos evaluar el bloqueo del flujo autofágico utilizando Vincristina (VCR). Esta sustancia perteneciente a la familia de alcaloides de la Vinca es capaz de prevenir la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, debido a su capacidad de inhibir la polimerización de microtúbulos inhibiendo así el tráfico vesicular (Amenta *et al.*, 1977; Mackeh *et al.*, 2013; Munafo *et al.*, 2001).

Al realizar los ensayos de citometría utilizando VCR, se observó que este tratamiento no generó efecto citotóxico a 72hs en la línea Raji dentro del rango 0.005 a 2 μ M (Fig. 3.35A, B). Además, a concentraciones superiores a 0.5 μ M, el porcentaje de células positivas para MDC detectado fue prácticamente nulo luego de 72hs, lo que probablemente se deba a la supresión completa y persistente de la actividad autofágica por compromiso de la red de microtúbulos (Fig. 3.35B).

Asimismo, luego de adicionar VCR a las células previamente tratadas con Rapamicina $0.25\mu\text{M}$ por 24hs, observamos un claro aumento del contenido de autofagosomas a las 2hs de incubación, demostrando así que se había bloqueado el flujo autofágico al poco tiempo de tratamiento con VCR. Luego del aumento inicial se observó una disminución progresiva del porcentaje de células MDC positivas en el transcurso del tiempo, volviendo a niveles similares al basal luego de 3.5hs (Fig. 3.35C).

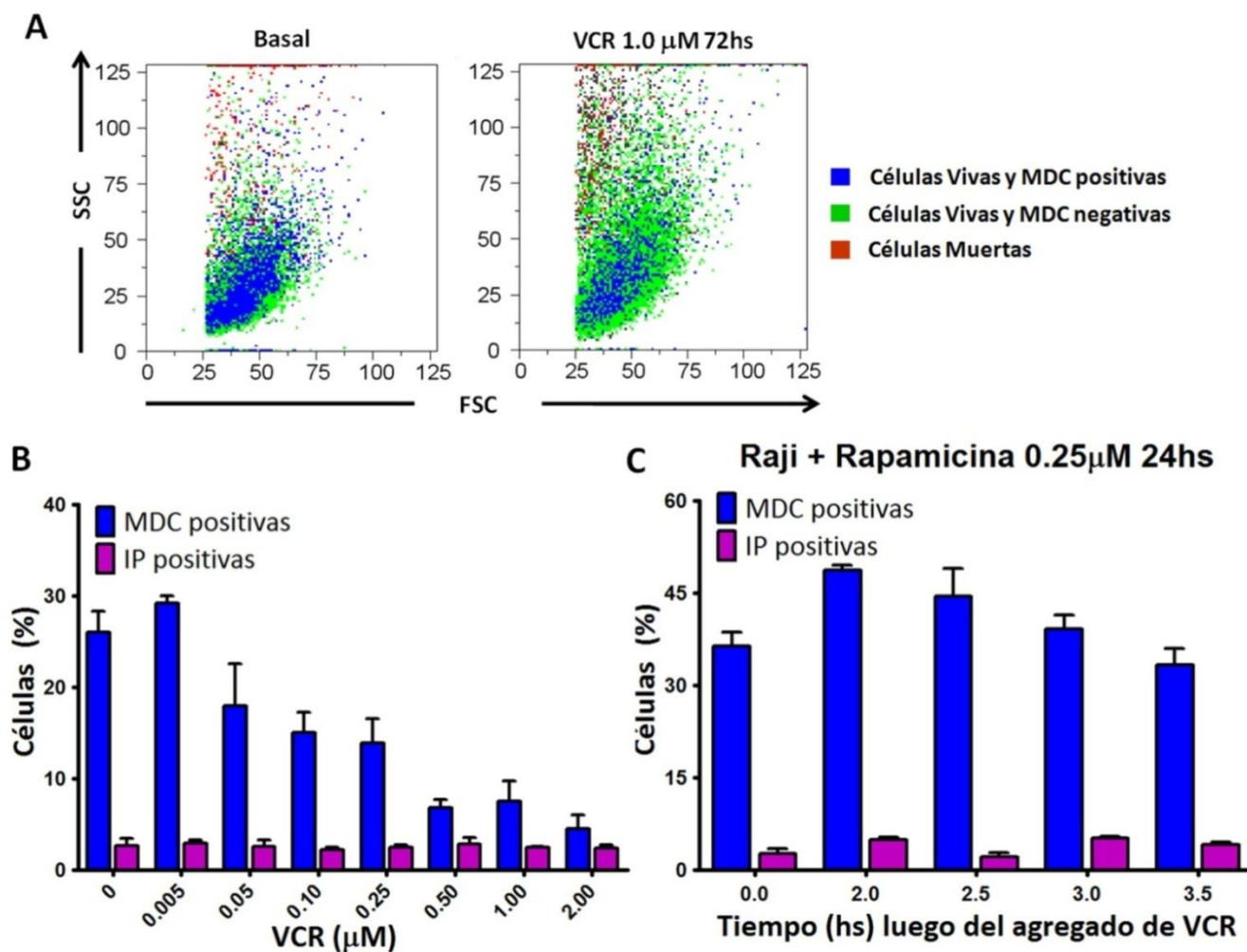


Figura 3.35. Inhibición de autofagia por tratamiento con VCR. Se muestran Dot-plots correspondientes a un ensayo de citometría de 3 colores de células tratadas con VCR para determinación de autofagia y muerte celular a 72hs (A). En (B) se muestra un gráfico de barras señalando el porcentaje de células Raji MDC positivas (células viables conteniendo autofagosomas), y el porcentaje de células muertas (IP positivas) en presencia de concentraciones crecientes VCR luego de 72hs de incubación. El gráfico de barras (C) corresponde a un ensayo de bloqueo de autofagia inducida por Rapamicina mediante el co-tratamiento con VCR $1\mu\text{M}$ en función del tiempo. Las muestras fueron ensayadas por triplicado y las barras de error indican \pm SD alrededor de la media.

Como ya se comentó previamente, la cantidad de LC3II detectada por WB tampoco es una medida directa del flujo autofágico, sino que es necesario observar el aumento de los niveles de esta proteína luego de la exposición de las células a un bloqueante del flujo. Los cambios en el flujo autofágico detectados por WB de LC3 con diferentes tratamientos se muestran en la [Fig. 3.36](#). En este caso se utilizó NH_4Cl como bloqueante de flujo autofágico, el cual se acumula en los lisosomas neutralizando su pH y bloqueando la etapa degradativa de la autofagia, siendo por esta razón frecuentemente utilizado con este propósito ([Klionsky et al., 2016a](#)). Observamos que al tratar las células por 24hs con un inductor de autofagia como la Rapamicina en presencia de NH_4Cl , se generó un aumento en la cantidad relativa de LC3II, con respecto al tratamiento con Rapamicina en ausencia de NH_4Cl . Resultados similares se obtuvieron para VPA 3mM (el cual había aumentado el porcentaje de células MDC positivas en ensayos previos, [ver Fig. 3.35B](#)) y lo mismo se observó para TOA+MG132. Este tipo de comportamiento es característico de compuestos capaces de inducir autofagia.

Por el contrario, en el caso de los compuestos que actúan como bloqueantes de flujo no deberían generarse grandes diferencias en los niveles de LC3II en presencia o ausencia de NH_4Cl . Este tipo de comportamiento fue el que se observó para el caso de VPA 3mM+VCR 1 μM , confirmando así la capacidad de VCR de bloquear las etapas tardías del proceso autofágico como se sugería a partir de los resultados previos ([Fig. 3.35](#)).

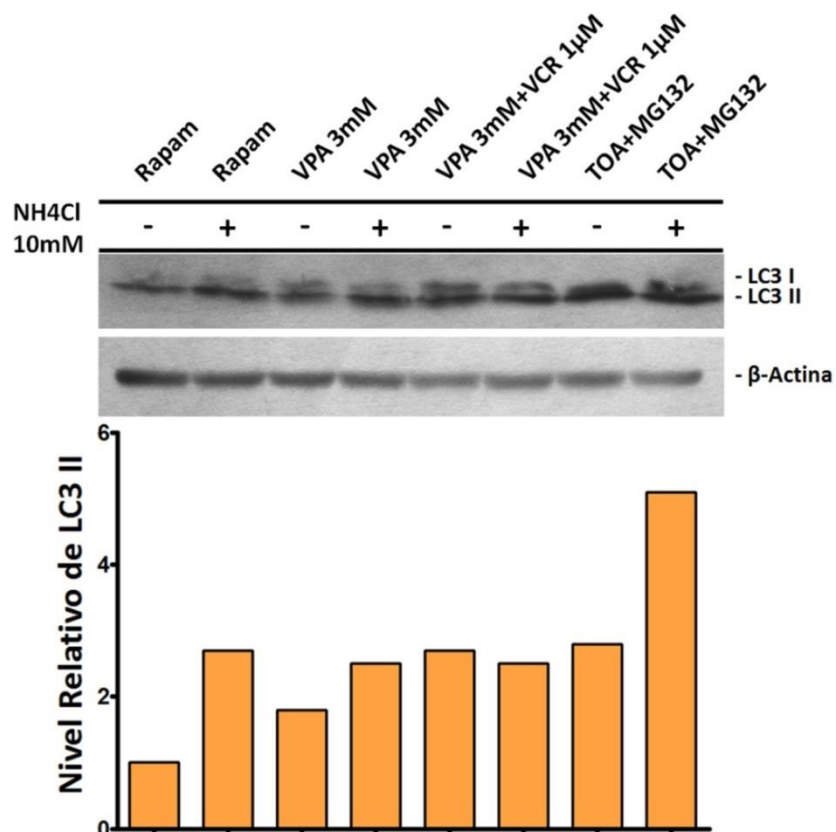


Figura36. Inhibición de flujo autofágico mediante NH4Cl. Células Raji tratadas con los compuestos indicados por 24hs y luego incubadas por 4hs más en ausencia o presencia de NH4Cl 10mM para bloquear el flujo autofágico. Luego se realizó la evaluación de la diferencia en el contenido de LC3 II por WB en presencia y ausencia de NH4Cl como indicador de cambios en el flujo autofágico (gráfico de barras).

3.4.4 MDC marca Autofagosomas pero no lisosomas

En algunos casos se ha sugerido que la MDC podría actuar también como marcador de lisosomas o autofagolisosomas, por lo que ha cuestionado su capacidad de detectar los eventos tempranos del proceso autofágico. Para excluir esta posibilidad realizamos dos ensayos: la transfección de las células Raji con pRFP-LC3 con posterior marcación utilizando MDC (Fig. 3.37) y una marcación combinada de las células con MDC y Naranja de Acridina (NA) (Fig. 3.38). Esta última sonda genera fluorescencia roja por acumulación en vesículas ácidas como los lisosomas. Por otra parte, la construcción pRFP-LC3 induce la expresión de una proteína LC3 acoplada a la proteína fluorescente roja (RFP, por sus siglas en inglés) que emite fluorescencia roja al excitarse con luz verde. En ausencia de autofagia la fluorescencia de RFP-LC3 es baja y difusa, mientras que en presencia de autofagia y

por acumulación en la membrana de los autofagosomas desde su formación más temprana, la fluorescencia de RFP-LC3 produce imágenes en forma de puntos gruesos o botones en la microscopía de fluorescencia.

Para evaluar la colocalización de los autofagosomas marcados con RFP-LC3 y con MDC, realizamos una superposición digital de las imágenes obtenidas en los dos canales (Fig. 3.37, Merge). Los gráficos bivariados de dispersión para fluorescencia de RFP-LC3 y MDC (Fig. 3.37, fila inferior), indicaron en todos los casos la presencia de una alta colocalización entre las estructuras marcadas con ambos fluoróforos, como se deduce de la gran aproximación a la diagonal $x=y$ (rojo=verde). Además, para los tratamientos con VPA y VPA+VCR, se observaron cambios con respecto al basal en la cantidad y distribución de los autofagosomas de células Raji transfectadas con pRFP-LC3. El tratamiento con VPA 3mM generó patrones de fluorescencia de tipo punteado, particularmente en áreas cercanas al núcleo que colocalizaron con MDC. El tratamiento con VPA+VCR generó una redistribución de los puntos fluorescentes hacia la periferia celular (Fig. 3.37).

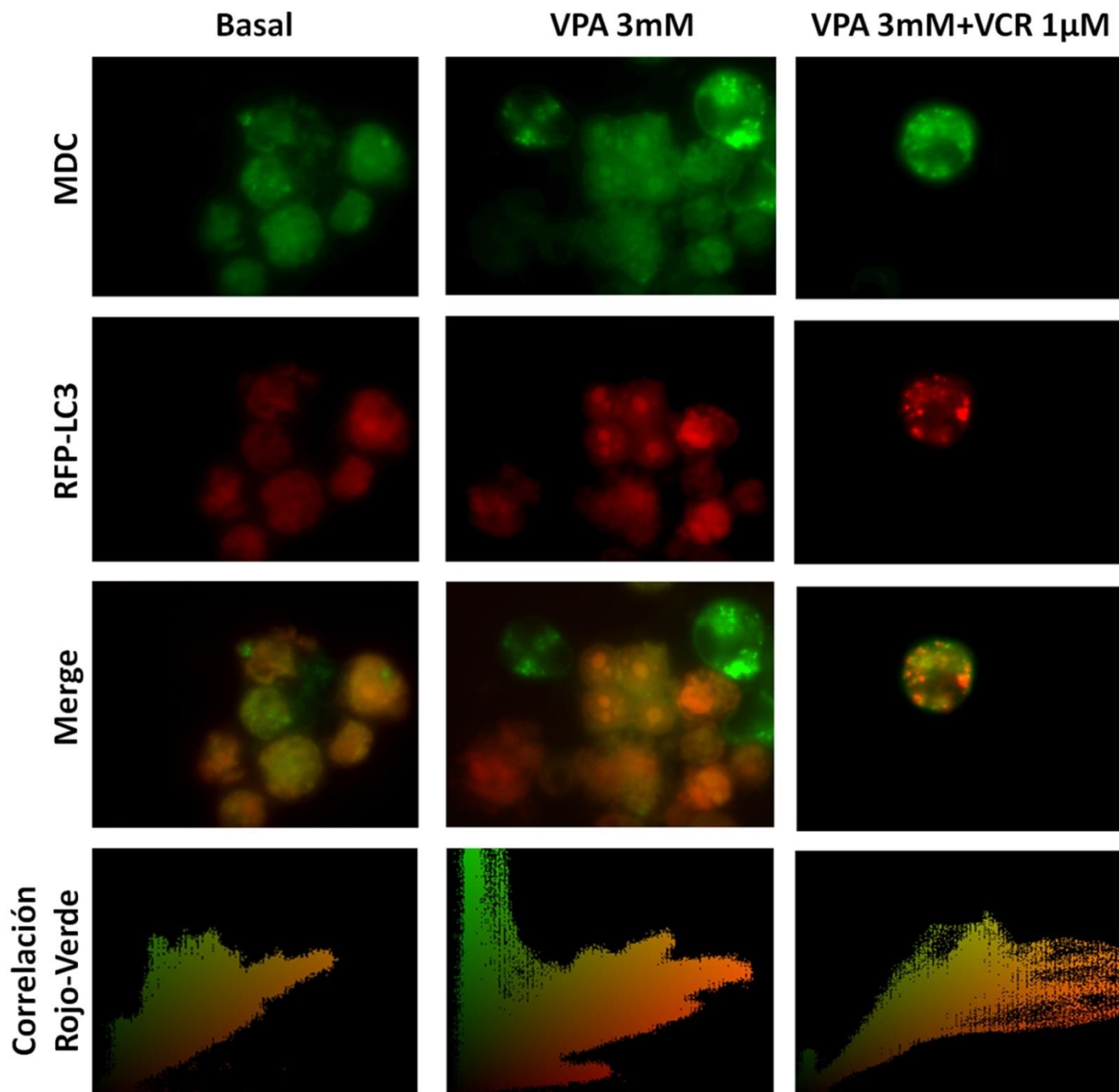


Figura 3.37. Estudio de colocalización entre MDC y autofagosomas en células transfectadas con pRFP-LC3. Las células Raji fueron transfectadas utilizando DMRIE-C por 48hs y posteriormente tratadas por 24hs con VPA 3mM y VPA 3mM+VCR 1 μ M, realizándose finalmente la marcación con MDC 50 μ M. Se muestran imágenes obtenidas a partir de la detección de fluorescencia azul (MDC) y roja (RFP-LC3). Posteriormente se realizó la superposición digital utilizando pseudocolores y se realizó un análisis de estándar de correlación rojo

a verde (fila inferior) en donde una distribución de puntos cercana a la recta de correlación $x=y$ indica un mayor grado de colocalización. Las desviaciones representadas por picos corresponden a células no transfectadas que solo presentan fluorescencia de MDC.

En el ensayo de doble marcación MDC/NA (Fig. 3.38), se observó la ausencia de colocalización entre vesículas marcadas con MDC y aquellas marcadas con NA, confirmando que la marcación con MDC en las condiciones usadas en este trabajo tiñe solo autofagosomas tempranos a intermedios, pero no autofagosomas tardíos de contenido ácido ni los lisosomas (Fig. 3.38, MDC). Por el contrario, NA marca en rojo los lisosomas y en verde otras estructuras de la célula pero no los autofagosomas. Sólo la fluorescencia roja de NA se debe a la acumulación de esta molécula en compartimentos ácidos (Fig. 3.38, fila NA (verde) y fila NA (rojo)).

Además, se observó un incremento del número de autofagosomas en el caso de los tratamientos con VPA 3mM y VPA 3mM+VCR 1 μ M a 24hs. Sin embargo, la presencia de vesículas MDC positivas fue prácticamente nula luego de 72hs de tratamiento con VPA 3mM+VCR 1 μ M probablemente debido a la inhibición de autofagia a largo plazo por la VCR (Fig. 3.38, MDC). Los resultados obtenidos concuerdan con la inhibición de la autofagia detectada previamente mediante citometría de flujo y WB (Figs. 3.35 y 3.36 respectivamente).

En contraste a lo observado en el caso de los autofagosomas, la cantidad de lisosomas fue baja en condiciones basales y el tratamiento con VPA, pero se incrementó por tratamiento con VPA+VCR a 24 y 72hs, probablemente debido al bloqueo del tráfico vesículas que previene fusión con los autofagosomas (Fig. 3.38, NA (Rojo)).

A partir de esta serie de ensayos logramos demostrar que el porcentaje de células marcadas con MDC mediante Citometría de Flujo de excitación UV, es un indicador válido y fiel para determinar autofagia, que nos permite detectar los cambios inducidos sobre este proceso por inductores y bloqueantes de flujo autofágico.

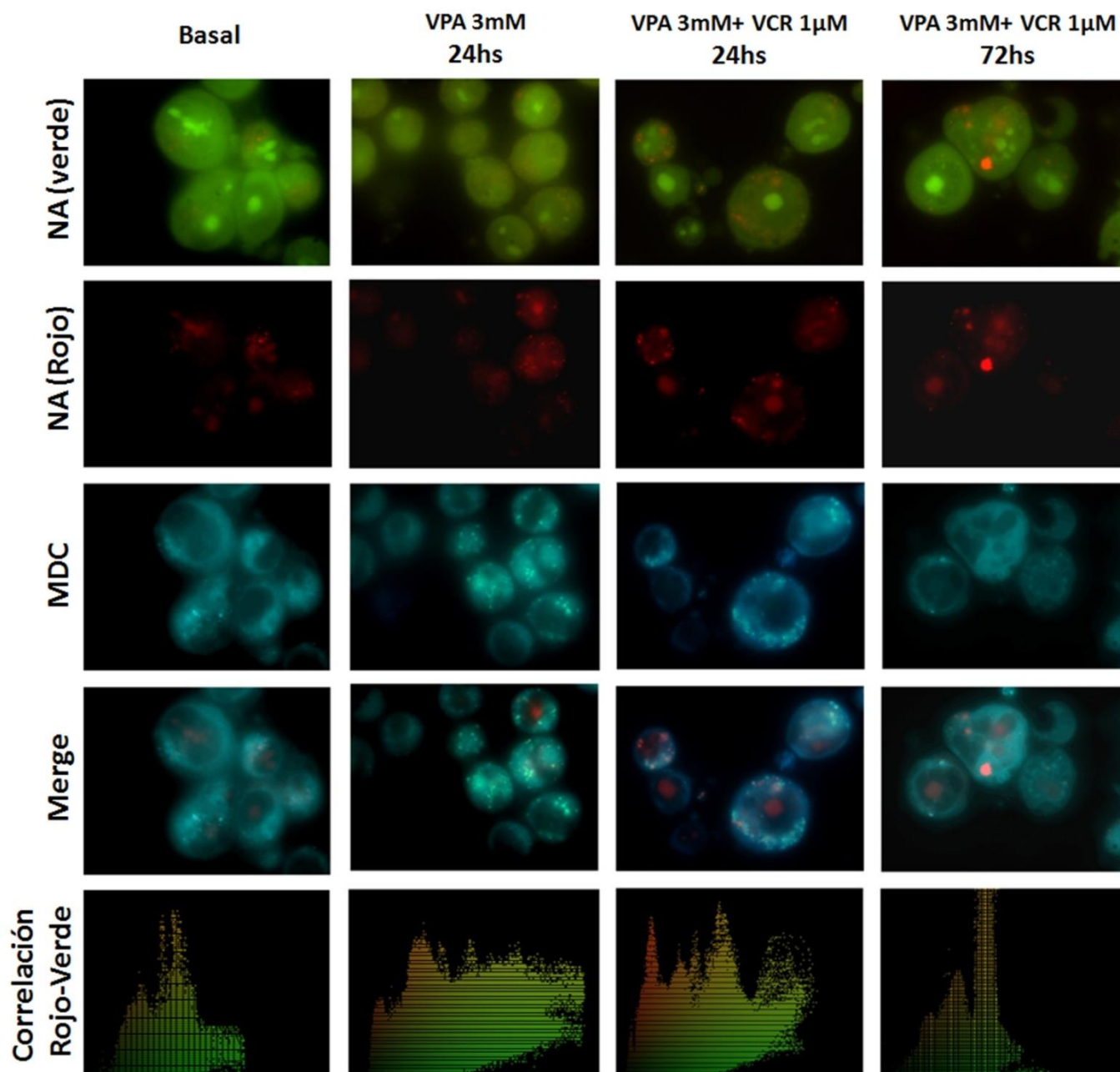


Figura 3.38. Marcación diferencial de autofagosomas y lisosomas en la línea Raji mediante MDC y NA. Imágenes de fluorescencia correspondientes a células Raji tratadas con VPA 3mM y VPA 3mM+VCR 1 μ M a los tiempos indicados y marcadas con MDC y NA. Para determinar la presencia de colocalización, la fluorescencia roja de NA se comparó con la azul de MDC usando pseudocolores y una herramienta de análisis de correlación rojo a verde (Image-Pro Plus 6.0). La imagen superpuesta de NA rojo + MDC (Merge) se muestra como cian vs rojo para evitar confusión con el canal verde de NA. Los gráficos de dispersión (fila inferior) muestran que la fluorescencia roja de NA y la azul de MDC no correlacionan y se alejan de la recta de identidad $y=x$. En las muestras que solo se marcaron con NA, no se detectó señal en los canales rojo y azul utilizando un

filtro UV 330-385nm U-MWB2. En muestras marcadas sólo con MDC no se detectó fluorescencia en el canal rojo utilizando un filtro U-MWB2 450-480nm (datos no mostrados).

3.4.5 Inducción de aumento en la autofagia por TOA+MG132

Una vez validado el método de MDC para la detección de autofagosomas por citometría de flujo, evaluamos el efecto de TOA+MG132 a 24hs sobre las células Raji, en un amplio rango de dosis citotóxicas. Es decir, se utilizaron las dosis que producen distintos niveles de muerte a 72hs para evaluar la posible inducción de autofagia a 24hs.

Con este ensayo, confirmamos que la combinación TOA+MG132 incrementa el porcentaje de células MDC positivas tanto en la línea Raji como en U937, luego de 24hs de exposición con las dosis citotóxicas ensayadas (CE30 CE50 y CE80) (Fig. 3.39). Esto coincide con lo observado anteriormente por WB para la CE50 de esta combinatoria (Fig. 3.32A y B). Además, no se observaron cambios apreciables en la viabilidad de las células a 24hs, a pesar de que estas dosis causan muerte celular a 72hs.

En otras palabras, la combinación TOA+MG132 incrementó la autofagia en las dos líneas celulares, aun cuando la combinación resulto sinérgica en una línea y antagónica en la otra. De esta manera queda prácticamente descartada la posibilidad de que únicamente diferencias en los niveles de autofagia inducidos pudieran explicar un tipo de interacción opuesto entre TOA y MG132 en ambas líneas celulares en estudio (sinergismo en U937 y antagonismo en Raji).

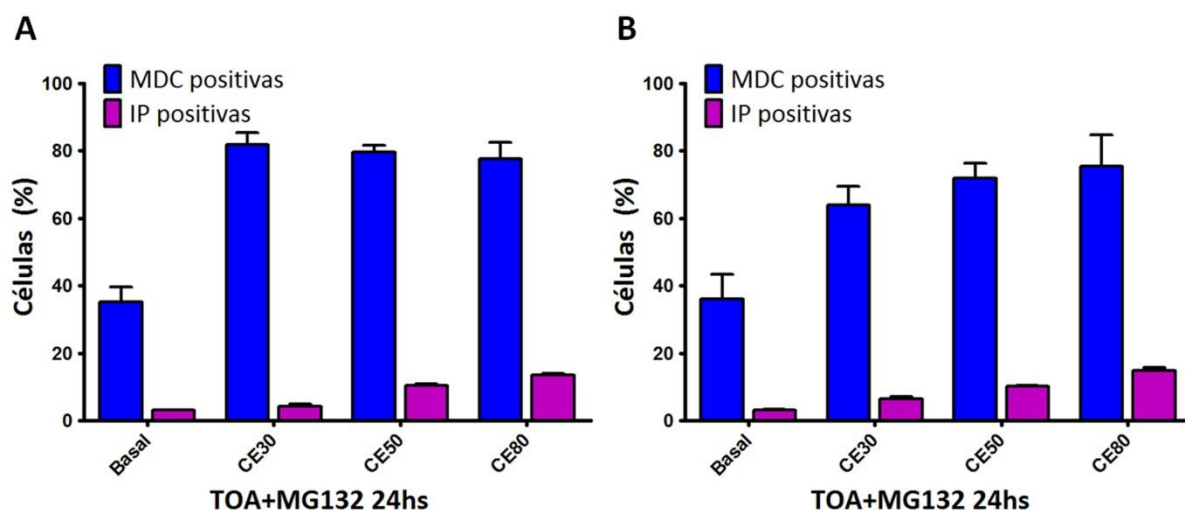


Figura 3.39. Inducción de autofagia a 24hs por TOA+MG132 en U937 y Raji. Gráficos de barras correspondientes a células Raji (A) y U937 (B) en los que se muestran los porcentajes de células viables con

autofagosomas (MDC positivas) y de muerte celular (IP positivas) en presencia de distintas CE de la combinatoria TOA+MG132 a 24hs de tratamiento (las CE correspondientes se detallan en la Tabla 3.1).

Para confirmar esta suposición, decidimos evaluar el efecto de la inhibición del proceso autofágico sobre el tipo de interacción entre TOA y MG132 en la línea Raji. En este sentido, realizamos un ensayo de citotoxicidad a 72hs sobre esta línea con TOA+MG132 en presencia de VCR subcitotóxica (Fig. 3.40). Este ensayo mostró que a pesar de la inhibición de la autofagia por VCR, la combinatoria se siguió comportando de manera antagónica en todo el rango de efecto citotóxico con un CI mínimo de 1.09 y que, al igual que lo observado en ausencia de VCR (ver Fig. 3.30A), el antagonismo es mucho más marcado para concentraciones de TOA+MG132 que generan bajos niveles de muerte celular.

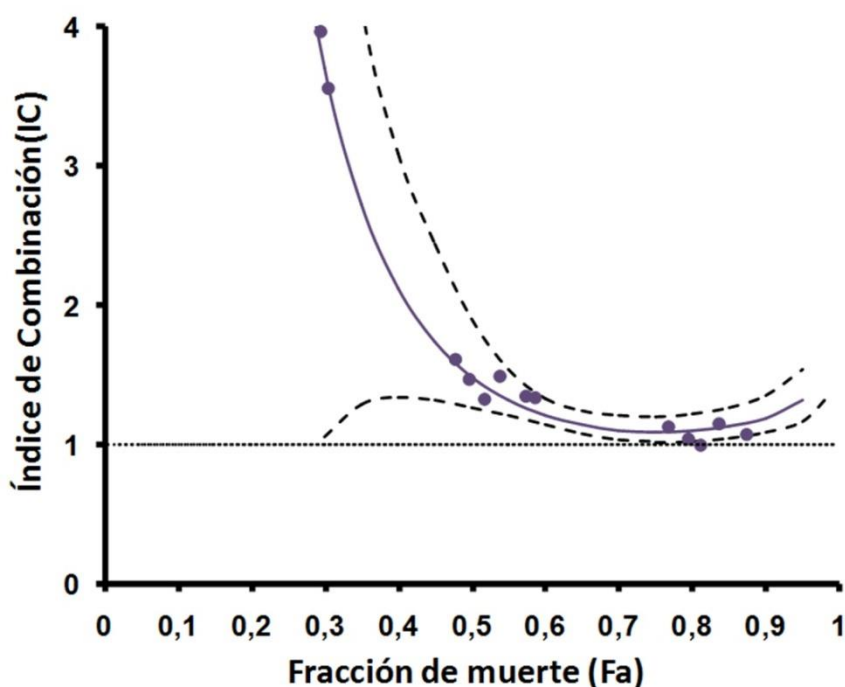


Figura 3.40. Influencia de VCR subletal sobre el efecto citotóxico de TOA +MG132 en Raji. Gráfico de CI en función del nivel de efecto citotóxico correspondiente a células Raji tratadas con TOA+MG132 en presencia de VCR subcitotóxica. Se muestran los datos experimentales (puntos) y la curva calculada a partir de los mismos (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas). Se observa un $CI > 1$ en todo el rango de efecto indicando una interacción antagónica.

3.4.6 Sinergismo TOA+MG132 en la línea Raji en presencia de VPA+VCR

Hasta este punto, hemos demostrado que la combinatoria TOA+MG132 posee un efecto diferencial sobre las células U937 y Raji, actuando de manera sinérgica en la primera y antagónica en la segunda. También demostramos que el sinergismo en U937 se asocia a una baja producción de O_2^- durante las primeras horas de tratamiento (ver Bloque II de resultados).

En cuanto a la línea Raji, demostramos que estas células tienen silenciado el gen de BNIP3, proteína que se piensa interviene de manera significativa en la muerte mediada por TOA y planteamos este fenómeno como un posible mecanismo de resistencia a la combinatoria. Posteriormente demostramos que este silenciamiento podía revertirse con concentraciones subletales de VPA. Sin embargo, observamos que a pesar de lograr aumentar la expresión de BNIP3, la combinatoria seguía comportándose de manera antagónica en Raji, lo que sugiere que el silenciamiento de BNIP3 no sería el único mecanismo de respuesta al estrés inducido por TOA+MG132 que la célula pone en juego (ver Bloque IIIA de resultados).

Luego evaluamos la autofagia como otro posible mecanismo de resistencia a la combinatoria, demostramos que TOA+MG132 es capaz de inducir altos niveles de autofagia en la línea Raji y que este proceso puede ser inhibido por VCR en concentraciones subcitotóxicas ($1\mu M$). Sin embargo, al analizar la respuesta a TOA+MG132 en presencia de VCR $1\mu M$, nuevamente observamos una interacción de tipo antagónica en la línea Raji.

En base a estos resultados nos propusimos estudiar el efecto de la combinatoria TOA+MG132 tanto en presencia de VPA como de VCR. De esta manera, estaríamos aumentando la expresión de BNIP3 (silenciada de manera basal en la línea Raji y necesaria para la muerte mediada por TOA) y a la vez inhibiendo el proceso autofágico que había sido sugerido como un mecanismo de resistencia concomitante.

Cuando se realizó el ensayo de citotoxicidad de TOA+MG132 en presencia de dosis subletales de VPA y VCR a concentraciones subcitotóxicas, se observó que en estas condiciones la combinatoria mostraba sinergismo a niveles de efecto altos (mayores a CE50) con un CI mínimo de 0.70 correspondiente a la CE75 de la combinatoria (Fig. 3.41).

De esta manera se logró demostrar que para volver sensible a la línea Raji a la combinatoria TOA+MG132, es necesaria no solo la expresión de altos niveles de BNIP3 sino también la inhibición del proceso autofágico que actúa como mecanismo de respuesta al estrés inducido por TOA.

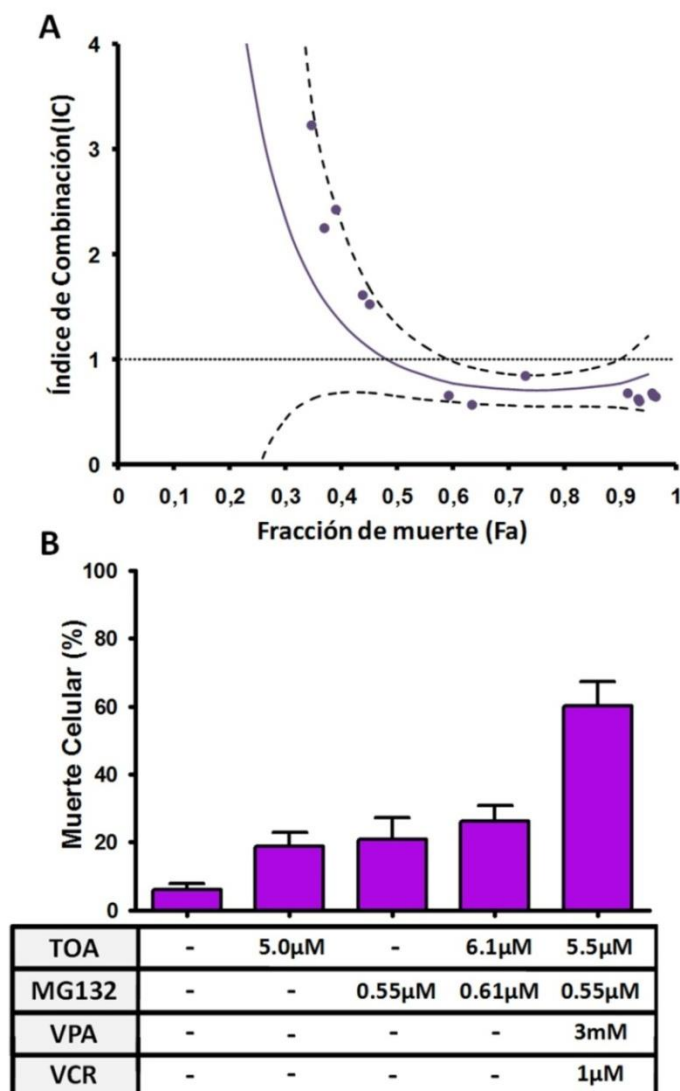


Figura 3.41. Sinergismo TOA+MG132 en células Raji en presencia de VPA+VCR subletal. El panel A muestra un gráfico de CI en función del nivel de efecto citotóxico, correspondiente a células Raji tratadas con TOA+MG132 en presencia de VPA 3mM y VCR 1 μ M (concentraciones subcitotóxicas). Se muestran los datos experimentales (puntos) y la curva calculada a partir de los mismos (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas). Se observa un $CI < 1$ para niveles de efecto mayores a CE50 indicando una interacción sinérgica. El panel B muestra con propósito ilustrativo, un mayor detalle de los

resultados de efecto citotóxico de TOA y MG132 en forma individual y combinada, correspondientes a uno de los puntos experimentales evaluados para determinar el CI.

Además, mediante ensayos de IF para BNIP3 se observó que en presencia de TOA+MG132 el co-tratamiento con VPA+VCR generó un cambio de distribución de la proteína BNIP3 dentro de la célula, observándose una distribución homogénea en todo el citoplasma, en contraposición a lo observado en el caso de VPA sólo, en donde BNIP3 se encontraba distribuida en zonas perinucleares y alejada de la periferia de la célula (Fig. 3.42).

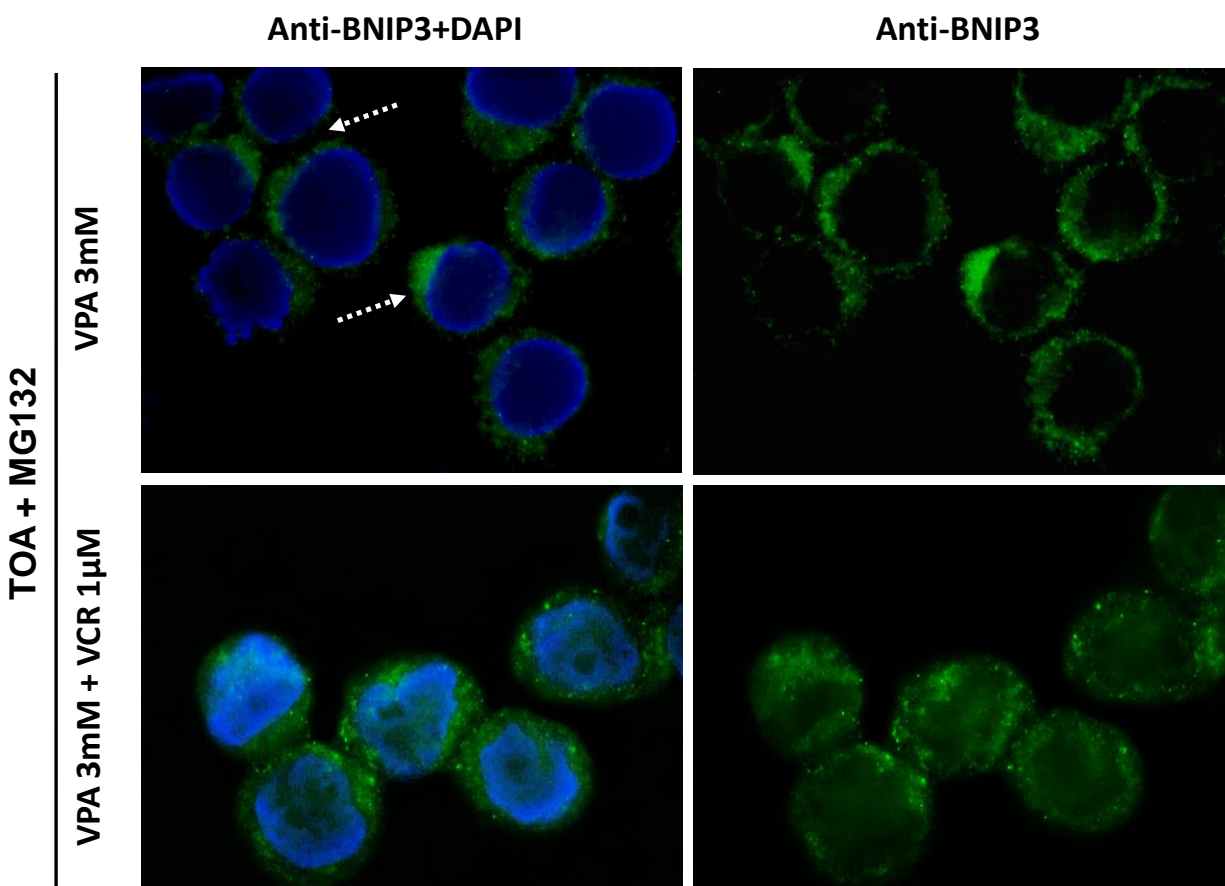


Figura 3.42. La localización celular de BNIP3 inducida por VPA en células Raji se modifica por tratamiento con VCR. Se muestran imágenes de inmunofluorescencia para la detección de BNIP3 en células Raji tratadas por 24 hs con la combinatoria TOA+MG132 en presencia de VPA 3mM (paneles superiores) y VPA 3mM+ VCR 1 µM (paneles inferiores) en donde se observan los cambios en la distribución de la proteína en

el área celular. BNIP3 pasó de ubicarse en zonas cercanas al núcleo (flechas) a una distribución uniforme en todo el citoplasma en presencia de VPA+VCR subletal.

3.5 Eliminación de mitocondrias como forma de resistencia al TOA combinado con MG132

3.5.1 Efecto de los tratamientos sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Como sabemos, uno de los principales blancos celulares sobre los que actúa el TOA es la mitocondria. El daño generado por TOA sobre esta organela se traduce generalmente en la pérdida del potencial de membrana debido a una alteración de la cadena de transporte de electrones (Chou *et al.*, 2005; Sumi *et al.*, 2010). El daño mitocondrial inducido provoca además la generación de importantes cantidades de $O_2^{\cdot-}$ (Sanchez *et al.*, 2010). Es por esto que a menudo se relaciona un aumento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ detectados con la presencia de mitocondrias dañadas.

Por otro lado, es necesario recordar que la proteína BNIP3, la cual parece ser un actor importante en la muerte mediada por TOA, puede tener una localización mitocondrial (Kubli *et al.*, 2007; Rikka *et al.*, 2011; Vande Velde *et al.*, 2000). Por estas razones el estudio del efecto de los tratamientos sobre las mitocondrias, es sumamente importante para interpretar de manera adecuada la respuesta de una determinada población celular a las drogas en estudio.

Para este fin realizamos ensayos de citometría de flujo a 24hs utilizando la sonda potenciométrica fluorescente TMRE. Esta molécula se acumula dentro de las mitocondrias que mantienen su PMM mientras que no lo hace en las mitocondrias despolarizadas, y esto se traduce en una disminución de la marca fluorescente. Además se utilizó la sonda supravital DAPI para excluir las células no viables del análisis.

Al analizar dichos ensayos, observamos que el tratamiento con TOA incrementó el porcentaje de células U937 con pérdida de PMM a 24hs alcanzando valores de despolarización cercanos al 40% (Fig. 3.43B). Este hecho se evidencia con la aparición de una población de células con baja intensidad de TMRE (células en la región RN1 de la Fig. 3.43A). MG132 no generó cambios en el porcentaje de células U937 con pérdida de PMM a 24hs, mientras que TOA+MG132 indujo un porcentaje de células con pérdida de PMM mayor que MG132, pero menor que TOA (Fig. 3.43B).

Aunque en la mayoría de los tratamientos se usaron CE50 a 72hs, la viabilidad a 24hs se mantuvo por encima del 80%, lo que se evidencia por la ausencia de células DAPI positivas (Fig. 3.43B). Esto indica que la pérdida de viabilidad de muchas de las células ocurre luego de las 24hs de exposición.

En contraste a lo ocurrido para U937, en la línea Raji ninguno de los tratamientos generó cambios en el porcentaje de células con pérdida de PMM, aunque si en la viabilidad celular (Fig. 3.43B). Este es un hecho llamativo ya que tanto TOA como TOA+MG132 generan un significativo aumento de los niveles de O_2^- a 24hs de tratamiento (ver Fig. 3.19A del bloque II de resultados).

Esta respuesta diferencial dependiente de la línea celular nos llamó particularmente la atención ya que, como se mencionó anteriormente, es común asociar la aparición de altos niveles de O_2^- al daño mitocondrial y particularmente a la pérdida de potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, a pesar de que los tratamientos mostraban perfiles similares en cuanto a la producción de O_2^- en ambas líneas, en Raji no se observó la presencia de mitocondrias despolarizadas luego de 24 hs de tratamiento con TOA o TOA+MG132.

Esto nos llevó a pensar en la posibilidad de que las células de la línea Raji estuvieran poniendo en juego un mecanismo de resistencia que les permitiera evitar y/o anular el daño mitocondrial generado por el TOA. En este sentido, varios autores indican que la generación de ERO en zonas cercanas al núcleo se relaciona con la activación de genes de resistencia frente a estímulos que generen daño oxidativo. Además ha sido demostrado que en muchos casos las mitocondrias dañadas por una noxa capaz de ejercer daño oxidativo, son trasladadas a zonas cercanas al núcleo, dando lugar a una distribución particular de estas organelas conocida como cluster mitocondrial perinuclear (CPNM) (Al-Mehdi *et al.*, 2010; Hallmann *et al.*, 2004). Este comportamiento en varios casos se asocia con resistencia a tratamientos que tienen como blanco la mitocondria (Al-Mehdi *et al.*, 2010; Rikka *et al.*, 2011).

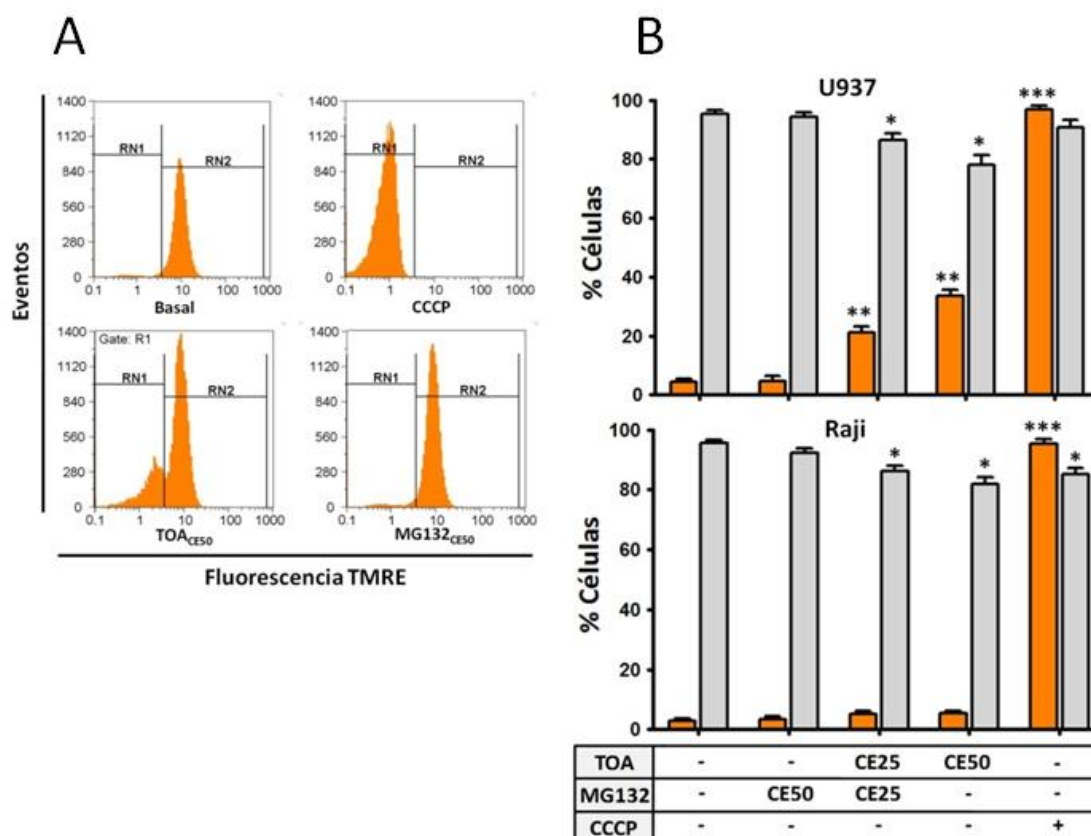


Figura 3.43. Efecto de TOA y MG132 sobre el PMM a 24hs. (A) Histogramas de fluorescencia correspondientes a células U937 marcadas con TMRE utilizados para determinar el porcentaje de células con pérdida de PMM (RN1) y con respecto a aquellas que aún lo mantienen (RN2). Para fijar el límite entre las dos poblaciones se trató una muestra con el agente desacoplante CCCP y el histograma obtenido se comparó con el del basal. Los gráficos de barras (B) muestran el porcentaje de células viables determinado por la exclusión de DAPI (barras grises) y células con pérdida de PMM (barras naranjas). Se realizaron al menos tres ensayos independientes a partir de los cuales se efectuó la comparación de los tratamientos vs el basal utilizando el post-test de Tukey-Kramer luego de un test de ANOVA significativo ($p < 0.001$). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$

3.5.2 Cambios en la distribución mitocondrial inducidos por TOA+MG132

En vista de todo lo expuesto anteriormente y considerando la influencia potencial de la morfología de la red mitocondrial en la respuesta a TOA y MG132, decidimos estudiar en ambas líneas celulares

la existencia de cambios en la distribución de las mitocondrias luego de los tratamientos. Para esto se realizaron ensayos de microscopía de fluorescencia marcando las mitocondrias con TMRE.

Al realizar el tratamiento de las células U937 con TOA+MG132 por 24hs, observamos que las mitocondrias marcadas con TMRE estaban distribuidas de manera homogénea por todo el citoplasma, mostrando frecuentemente fluorescencia distribuida cerca de la periferia celular (Fig. 3.44A). Una morfología similar se observó tanto en el basal como luego de los tratamientos con TOA y MG132 de manera individual (datos no mostrados).

Por el contrario, al ser tratada la línea Raji con TOA+MG132, observamos que las mitocondrias formaban grandes aglomeraciones particularmente en áreas centrales cercanas al núcleo y raramente se las observó en áreas marginales (Fig. 3.44B). Una distribución similar se observó para los tratamientos individuales (datos no mostrados).

Esta distribución diferencial de las mitocondrias en ambas líneas, se confirmó mediante el uso de Mitotracker Red (MTKred), una sonda fluorescente que se une covalentemente a estructuras mitocondriales, manteniendo la marcación aún luego de fijar las células (Fig. 3.44C y D).

Mediante la combinación de imágenes de contraste de fase e imágenes de fluorescencia de MTKred, pudimos obtener una medida del área relativa de la red mitocondrial en cada célula (Fig. 3.44E y F). Para esto comparamos el área de mitocondrias de cada célula obtenida por procesamiento digital de varias imágenes de MTKred, sobre el área celular total obtenida de las correspondientes imágenes de contraste de fase (Fig. 3.45) (para una descripción detallada del procedimiento ver la sección materiales y métodos). Los cambios en esta relación de áreas inducidos por los tratamientos, corresponden principalmente a dos factores: aumentos o disminuciones en la masa de mitocondrias que posee la célula y modificaciones importantes en la distribución de las mitocondrias. A esta relación área mitocondrial/área celular total la denominamos área mitocondrial relativa (AMR).

Al realizar este análisis, observamos que en las células U937 tratadas por 24hs con TOA y TOA+MG132, se incrementó de manera significativa el AMR con respecto al basal, mientras que el tratamiento con MG132 no generó cambios apreciables (Fig. 3.45A y C).

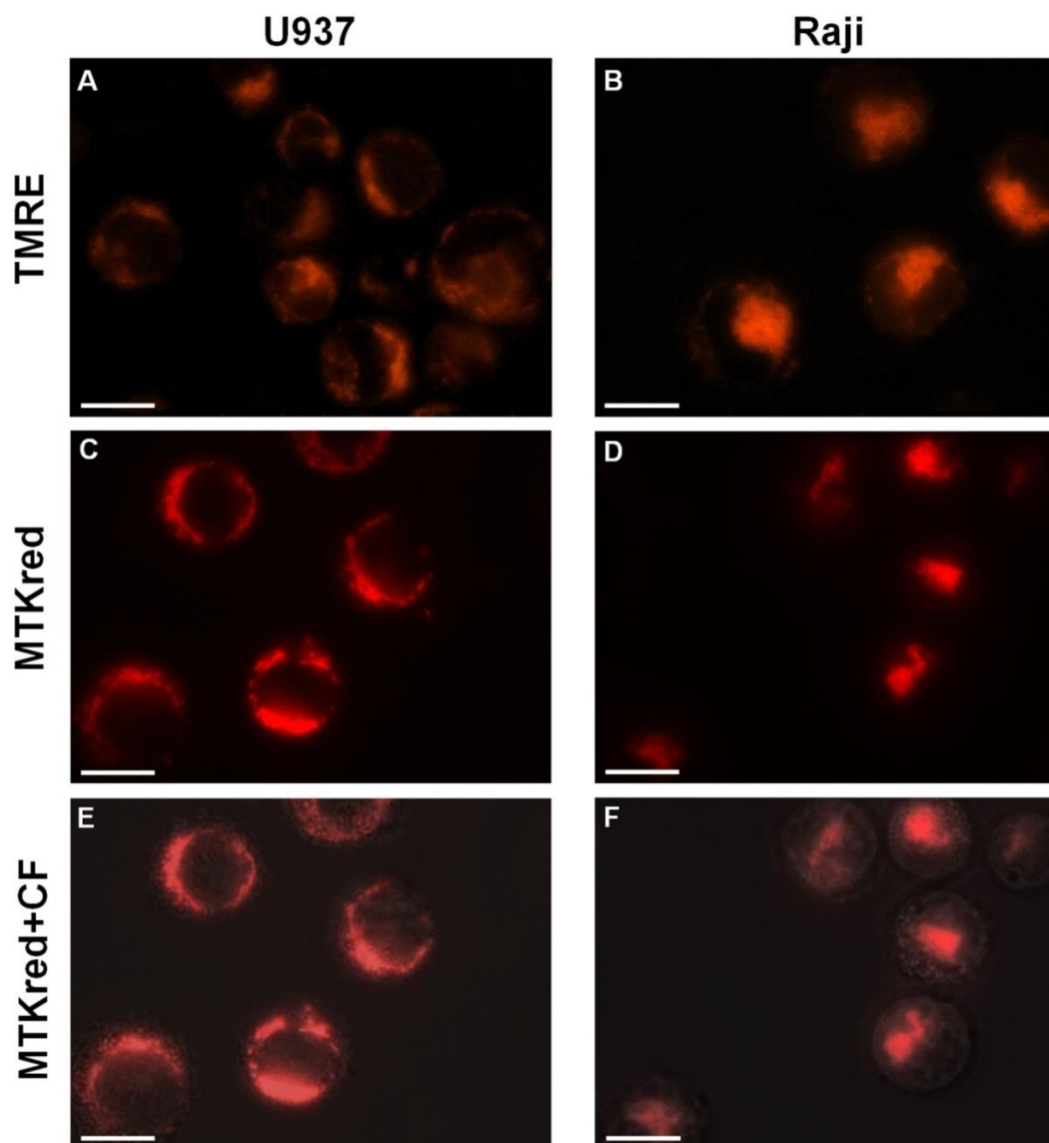


Figura 3.44. Distribución de las mitocondrias luego del tratamiento con TOA+MG132 por 24hs. Imágenes de fluorescencia de las células U937 (A) y Raji (B) marcadas con TMRE luego de 24hs de tratamiento con la CE50 de TOA+MG132, en donde se observa la diferente distribución de las mitocondrias polarizadas en el área celular. Esta distribución disímil de las mitocondrias entre las dos líneas celulares, se confirmó mediante marcación con MTKred, la cual se une covalentemente a las mitocondrias y es retenida incluso si hay pérdida del PMM (C y D). MTKred+CF muestra una superposición digital de la fluorescencia de MTKred y una imagen de contraste de fase del mismo campo (E, F). La barra de tamaño corresponde a 10 μm .

En contraste, las células Raji tratadas con TOA+MG132, mostraron una disminución significativa del AMR. Lo mismo ocurrió para el tratamiento con MG132 aunque el cambio fue de menor magnitud que en el caso de la combinatoria. Finalmente el tratamiento individual con TOA generó una leve disminución del AMR, aunque esta no llegó a ser estadísticamente significativa (Fig. 3.45B y D).

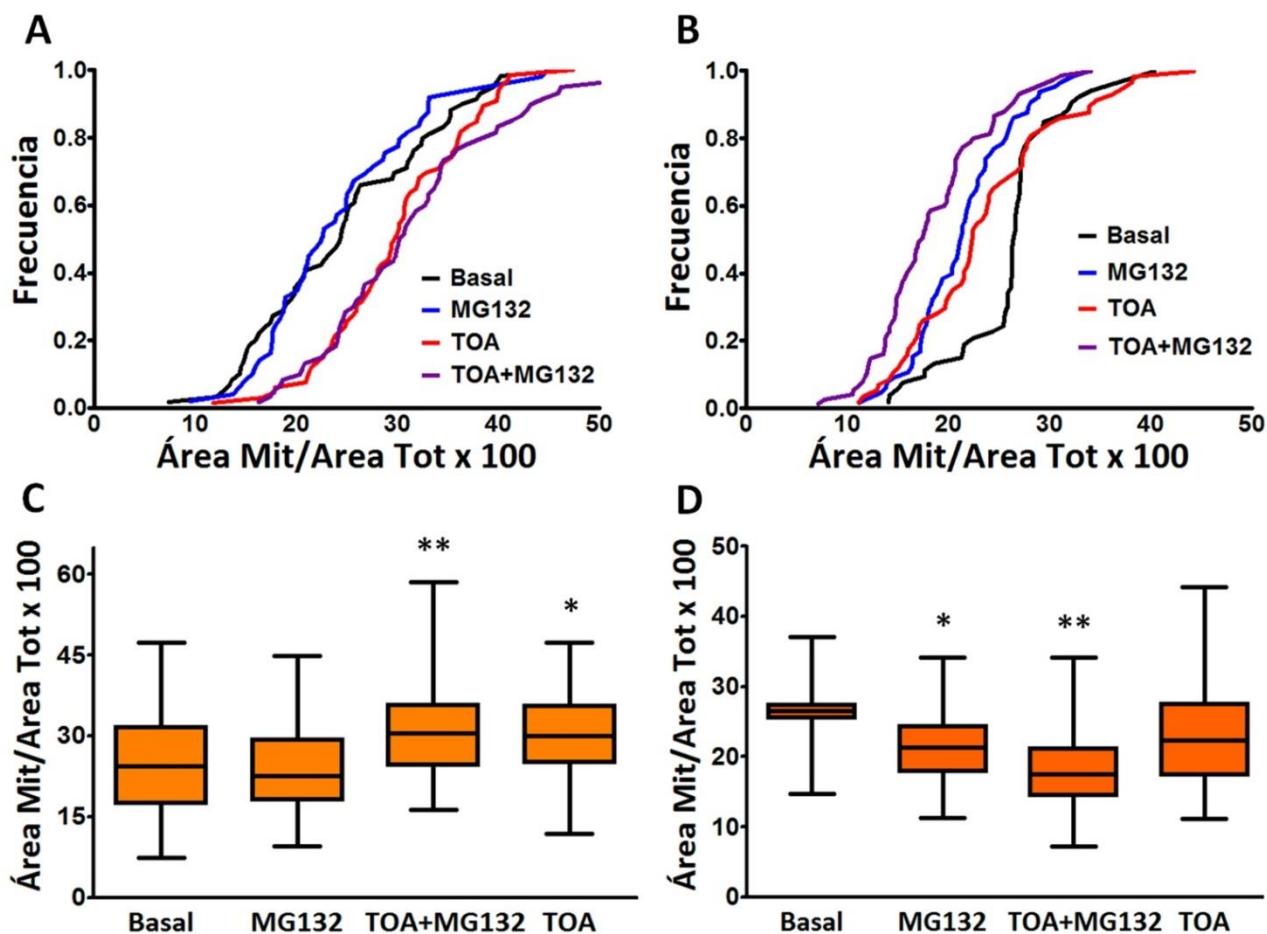


Figura 3.45. Modificaciones en el área mitocondrial relativa (AMR) inducidas por TOA y MG132.

Las imágenes de fluorescencia de MTKred y de contraste de fase se utilizaron para calcular el área mitocondrial y el área celular total respectivamente. Los gráficos superiores muestran la distribución de frecuencias acumulativa del AMR, luego de los tratamientos indicados en el caso de la línea U937 (A) y Raji (B). Se analizaron al menos 200 células de un mínimo de 50 imágenes en cada grupo. Los paneles inferiores corresponden a gráficos de Box-Whisker para células U937 (C) y Raji (D) con la probabilidad de significación correspondiente al post-test de Tukey-Kramer para la comparación tratamiento vs basal, luego de un test de ANOVA significativo ($p < 0.001$). * = $p < 0.05$ y ** = $p < 0.01$

3.5.3 Cambios en la masa mitocondrial inducidos por los tratamientos

Estos resultados sugieren la posibilidad de que las modificaciones en el AMR generadas por parte de los tratamientos en estudio (en particular la combinatoria TOA+MG132) sean debidas a cambios en la cantidad de mitocondrias. Por esta razón se realizaron ensayos adicionales para evaluar la masa mitocondrial celular y su variación en respuesta a los tratamientos. Esto se llevó a cabo mediante citometría de flujo utilizando la sonda NAO (Naranja de Nonil-Acridina). Esta molécula fluorescente es capaz de unirse específicamente a Cardiolipina, un lípido que en células eucariotas se encuentra de manera exclusiva en la membrana mitocondrial interna, permitiendo marcar todas las mitocondrias independientemente del PMM.

En la línea U937 observamos que tanto los tratamientos individuales como la combinatoria generaban un incremento de la masa mitocondrial en comparación con los niveles basales luego de 24hs. Por el contrario, en el caso de la línea Raji todos los tratamientos generaron la disminución de la masa mitocondrial, siendo ésta más marcada en los casos de TOA y TOA+MG132 (Fig. 3.46).

A partir de lo observado en los ensayos de microscopía de fluorescencia con MTKred y las citometrías con TMRE y NAO, parecería haber una relación entre la ocurrencia de cambios en la masa mitocondrial, la distribución de estas organelas dentro de la célula y la pérdida de PMM.

En otras palabras, al tratar la línea U937 con TOA (ya sea de manera individual o formando parte de la combinatoria) se estaría generando daño mitocondrial que se traduce en pérdida del PMM, acompañado de un aumento en la masa mitocondrial y un incremento en el área relativa mitocondrial.

En cambio, la línea Raji muestra un comportamiento totalmente opuesto. En estas células, el tratamiento con TOA, MG132 o TOA+MG132 genera una disminución de la masa mitocondrial, que se acompaña de una disminución del AMR, con localización en zonas cercanas al núcleo y alejadas de la periferia, sin que se detecte pérdida del PMM.

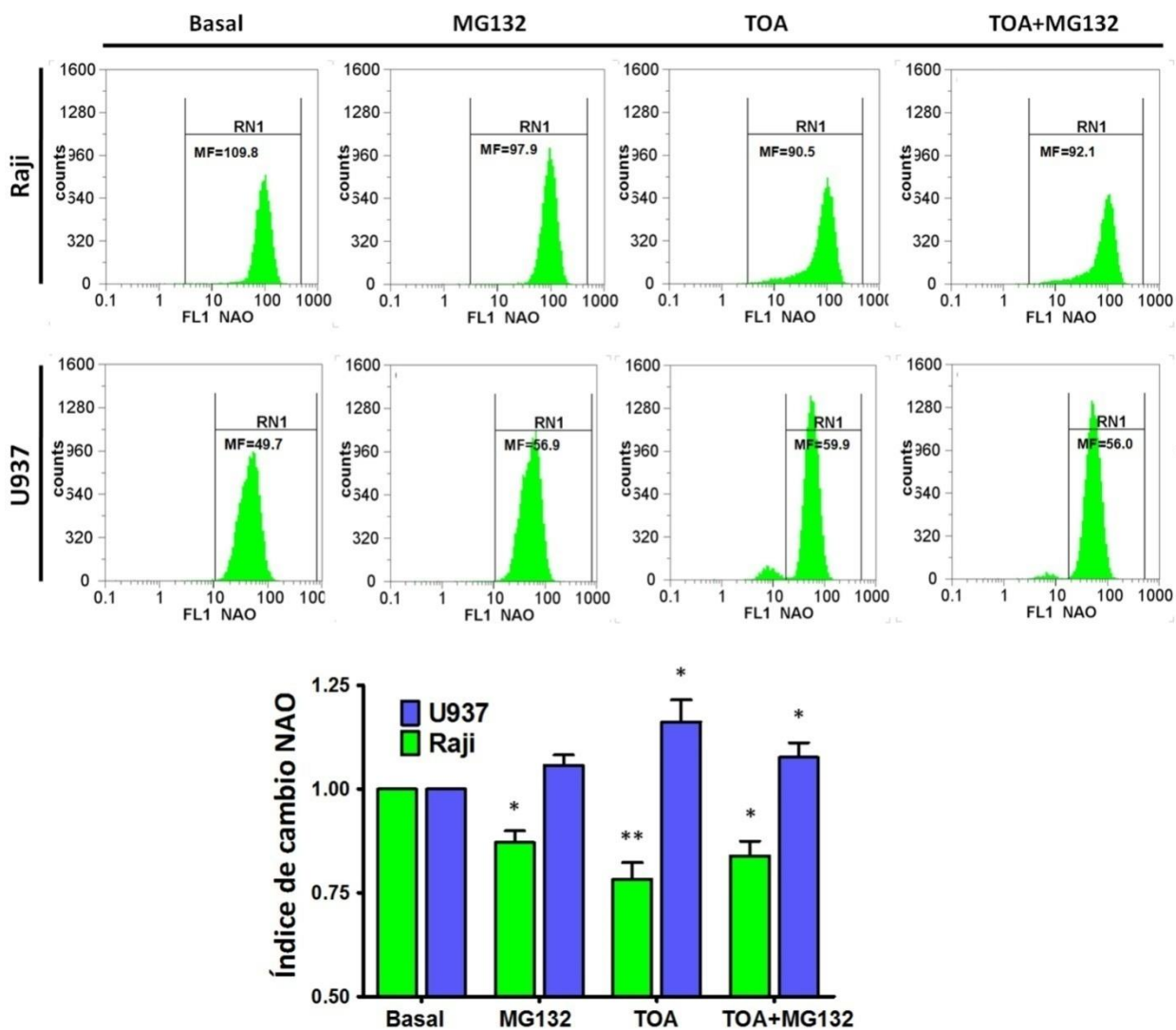


Figura 3.46 .Determinación de cambios en la masa mitocondrial mediante citometría de flujo. Las células se trataron por triplicado con las CE50 correspondientes de TOA, MG132 y TOA+MG132 por 24hs. Posteriormente se marcaron con NAO y se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas (A) corresponden a muestras representativas y se indica la correspondiente mediana de fluorescencia (MF). A

partir de estos datos se calculó el índice de cambio como MF del tratamiento/MF del Basal tal como se muestra en el gráfico de barras (B) que se realizó a partir de los datos obtenidos de tres o más experimentos independientes. La presencia de diferencias significativas con respecto al basal se evaluó mediante el Test de Kruskal-Wallis seguida de un Post-Test de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.5.4 Efecto de VPA+VCR subletal sobre la masa y la localización mitocondrial

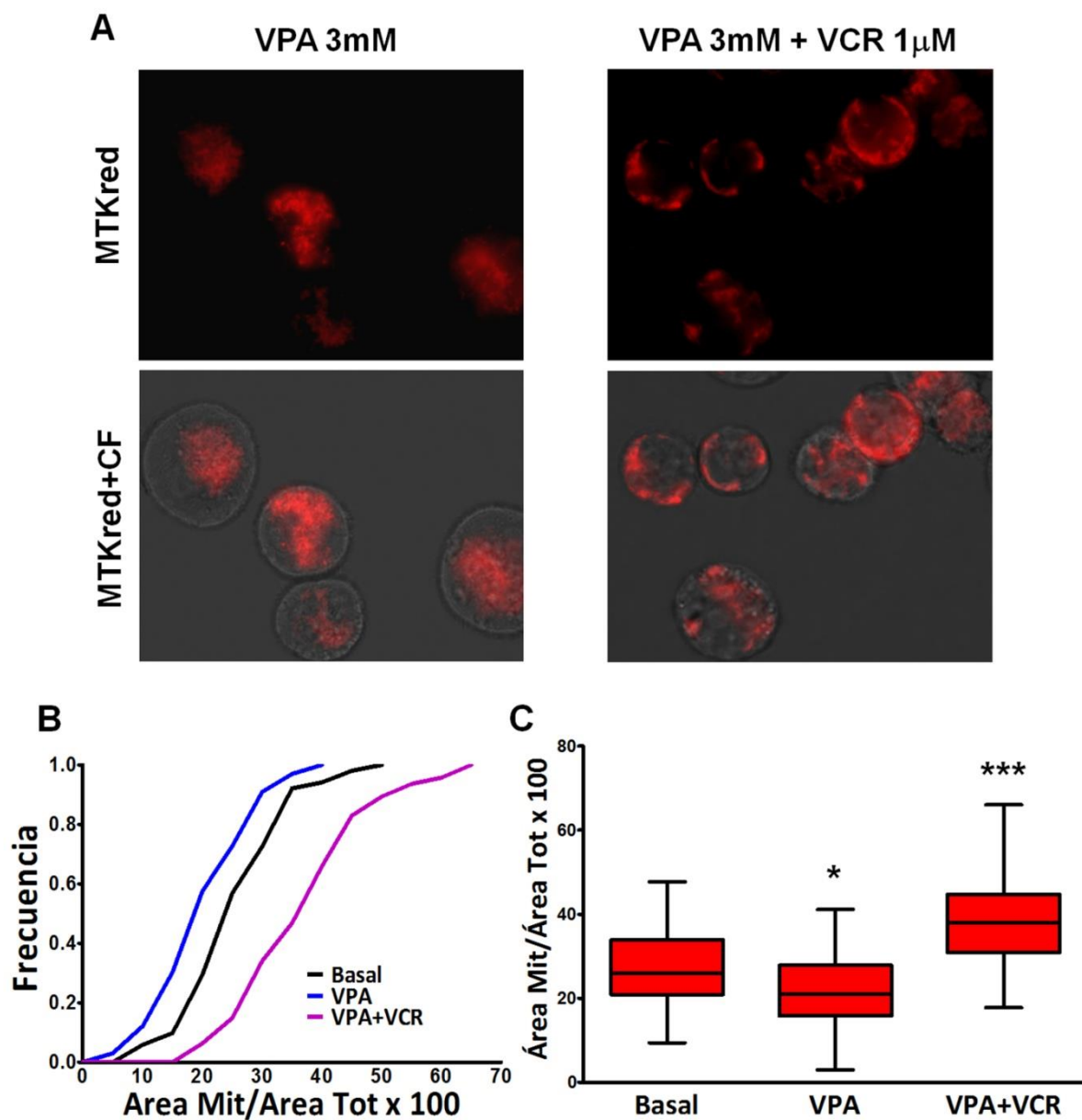
Esta serie de resultados nos llevó a pensar que la menor eficacia en la inducción de muerte de la combinatoria TOA+MG132 (antagonismo) observada en la línea Raji, podría deberse a que estas células responden a dicho tratamiento eliminando las mitocondrias dañadas por TOA. Este hecho explicaría la ausencia de mitocondrias despolarizadas y la disminución en la masa mitocondrial luego del tratamiento. Dicho proceso de eliminación de mitocondrias dañadas estaría teniendo lugar en zonas cercanas al núcleo, lo que explicaría los cambios observados en la distribución que llevan a la formación del CPNM, el cual, como ya se mencionó, se asocia generalmente a un perfil de resistencia a drogas que tienen como blanco la mitocondria.

Recordemos que el antagonismo TOA+MG132 observado en la línea Raji, pudo ser revertido a sinergismo mediante el co-tratamiento con dosis subletales de VPA y VCR, una droga epigenética que permite la expresión de BNIP3 y un inhibidor del flujo autofágico respectivamente. En base a esta observación, es lógico suponer que VPA y VCR puedan influir en dosis sub-letales sobre el estado del PMM, la distribución y la masa mitocondrial en la línea Raji. Para evaluar esta posibilidad realizamos un análisis de los cambios en la masa y distribución mitocondrial inducidos por VPA y VCR.

Cuando se realizó la marcación de mitocondrias de las células Raji tratadas por 24hs con VPA 3mM utilizando MTKred se observó que, al igual que lo que ocurre con la combinatoria TOA+MG132, estas organelas permanecían agrupadas alrededor del núcleo (Fig. 3.47A). Además el tratamiento con VPA generó una reducción del área fluorescente con respecto a las células no tratadas (Fig. 3.47B).

Sin embargo, luego del tratamiento de las células Raji con VPA 3mM+VCR 1 μ M se observó una redistribución de las mitocondrias hacia áreas periféricas, alejadas del núcleo celular y cercanas a la membrana celular (Fig. 3.47A). Este patrón de distribución de las mitocondrias fue muy semejante al observado en la línea U937 (Figs. 3.44C, E y 3. 48A). Además, el AMR se incrementó con respecto al basal en células Raji tratadas con VPA+VCR (Fig. 3.47B y C).

En células U937, el patrón basal de distribución de mitocondrias en la periferia de la célula no se modificó con ninguno de los dos tratamientos ensayados (Fig. 3.48A). En estas células el área relativa mitocondrial no se vio afectada por el tratamiento con VPA 3mM, pero se incrementó en el caso del



tratamiento con VPA+VCR (Fig. 3.48B y C).

Figura 3.47. Cambios en la distribución mitocondrial en Raji por tratamiento con VPA y VPA+VCR.

(A) Imágenes de distribución intracelular de mitocondrias marcadas con MTKred en células Raji tratadas por con las drogas indicadas por 24hs (paneles superiores) y de superposición de MTKred y una imagen de

contraste de fase del mismo campo (paneles inferiores). Las imágenes de fluorescencia de MTKred se utilizaron para analizar las células de manera individual y cuantificar el área de fluorescencia correspondiente a las mitocondrias con respecto al área total (B) de la misma forma que se indica en la Figura 3.43. Se muestran también gráficos de Box-Whisker (C) con los valores de p obtenidos utilizando el post-test de Tukey-Kramer para la comparación de los tratamientos vs el basal luego de un test de ANOVA significativo ($p < 0.001$). * = $p < 0.05$ y *** = $p < 0.001$.

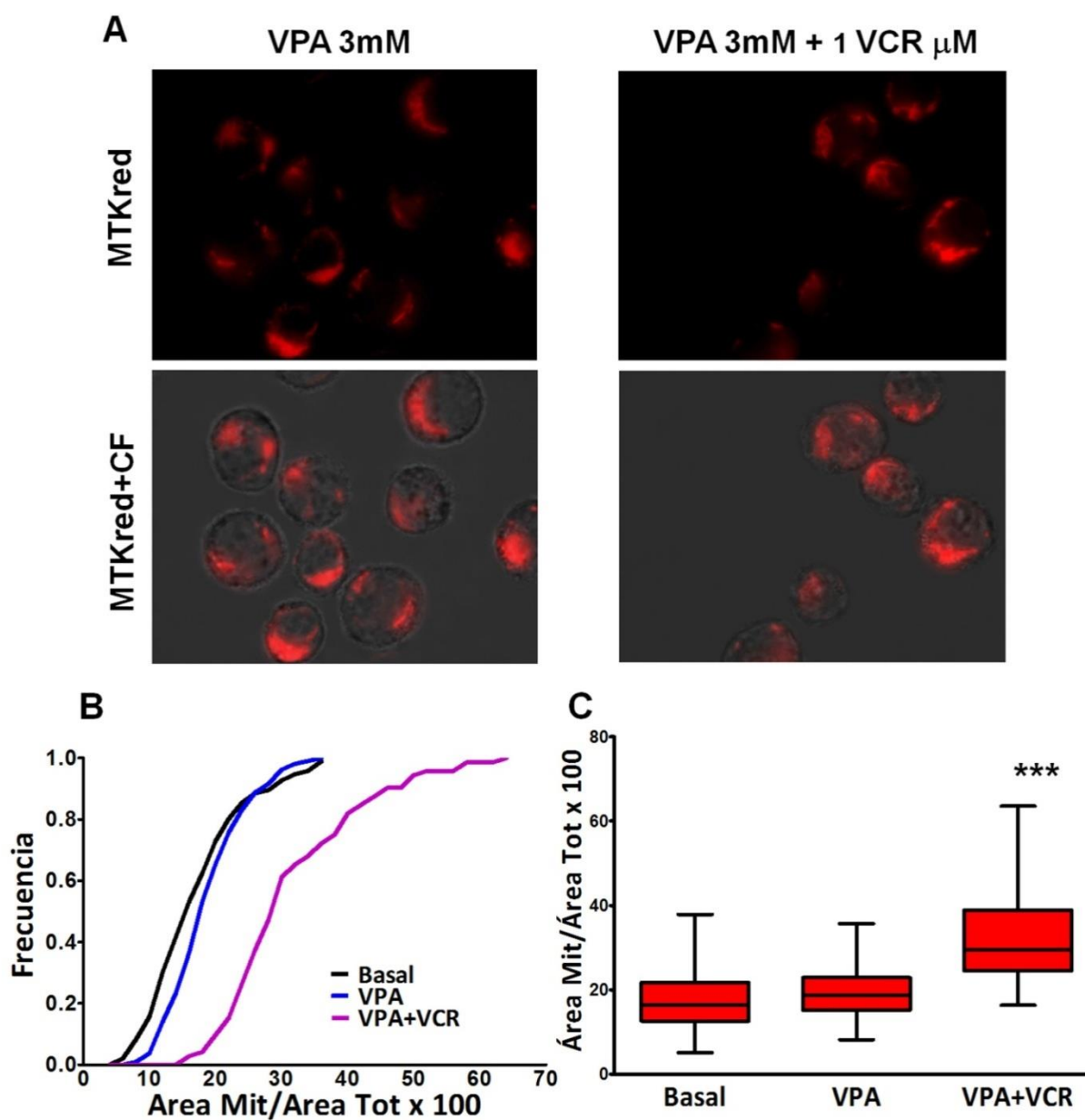


Figura 3.48. Distribución mitocondrial en U937 por tratamiento con VPA y VPA+VCR. (A) Imágenes de distribución intracelular de mitocondrias marcadas con MTKred en células U937 tratadas por con las drogas

indicadas por 24hs (paneles superiores) y de superposición de MTKred y una imagen de contraste de fase del mismo campo (paneles inferiores). Las imágenes de fluorescencia de MTKred se utilizaron para analizar las células de manera individual y cuantificar el área de fluorescencia correspondiente a las mitocondrias con respecto al área total (B) de la misma forma que se indica en la Figura 3.43. Se muestran también gráficos de Box-Whisker (C) con los valores de p obtenidos utilizando el post-test de Tukey-Kramer para la comparación de los tratamientos vs el basal luego de un test de ANOVA significativo ($p < 0.001$). * = $p < 0.05$ y *** = $p < 0.001$

Como ya se dijo, los cambios en el AMR están determinados por modificaciones en la masa y la distribución mitocondrial de manera simultánea. Para medir el efecto de cambio en la masa mitocondrial de manera individual, realizamos un ensayo por citometría de flujo utilizando la sonda NAO, luego de tratar ambas líneas con dosis subletales de VPA y VPA+VCR por 24hs. Al analizar los resultados observamos que VPA incrementó la masa mitocondrial en ambas líneas celulares. El aumento fue aún mayor en el caso del tratamiento con VPA+VCR (Fig. 3.49). De esta manera confirmamos que el tratamiento con concentraciones sub-letales de VPA+VCR es capaz de generar cambios en la distribución de las mitocondrias en la línea Raji hacia la periferia celular y que estos cambios se asocian con un aumento de la masa mitocondrial.

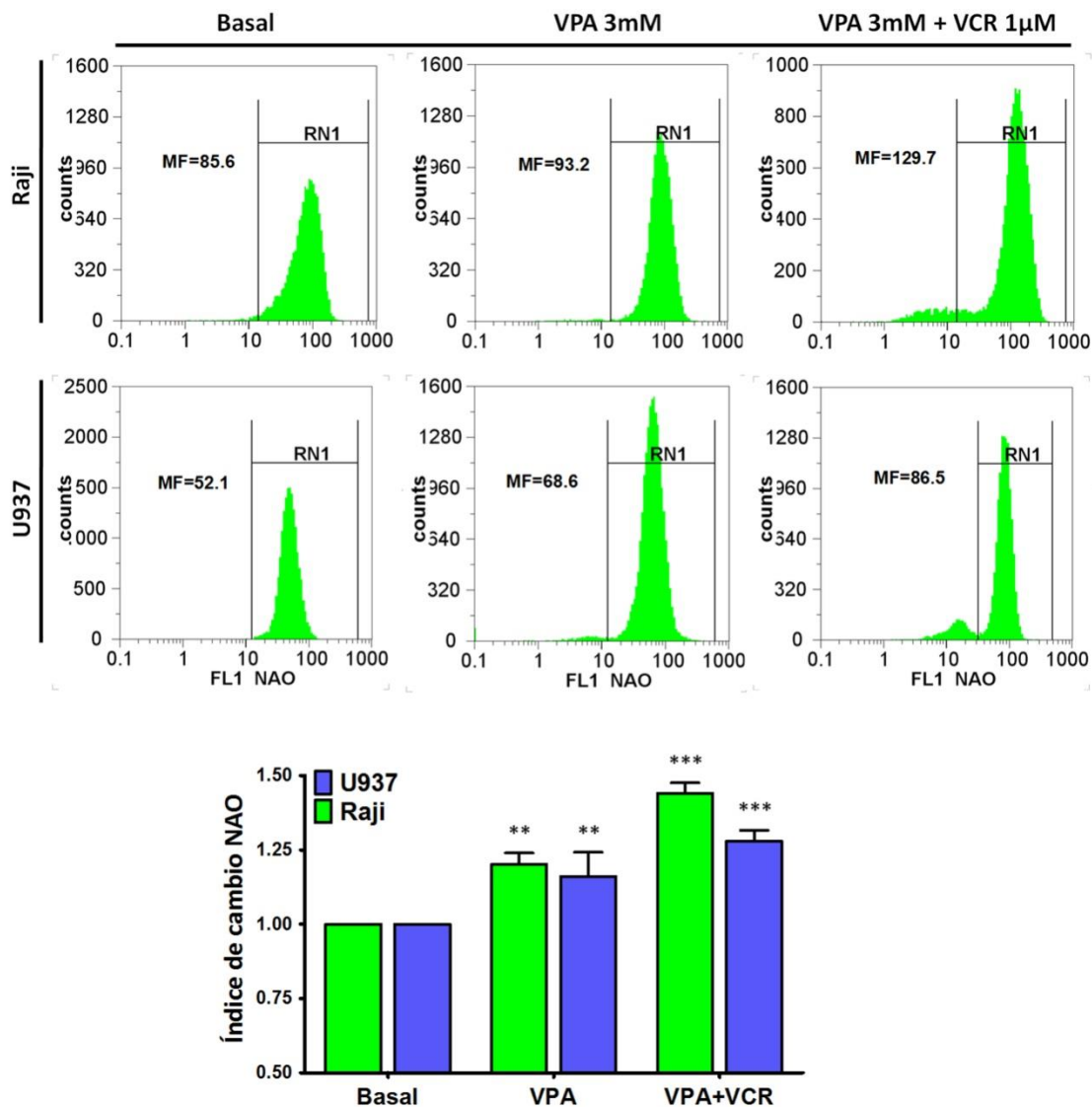


Figura 3.49. Cambios en la masa mitocondrial inducidos por VPA y VPA+VCR. Las células se incubaron por 24hs con los tratamientos indicados en la figura, posteriormente se marcaron con NAO y se evaluaron por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de cada tratamiento con su correspondiente mediana de fluorescencia (MF). El gráfico de barras muestra el índice de cambio para la MF del basal y los tratamientos (índice de cambio= $MF_{tratamiento} / MF_{basal} \times 100$). La presencia de diferencias significativas con respecto al basal se evaluó mediante el Test de Kruskal-Wallis seguida de un Post-Test de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A la luz de estos resultados se podría sugerir que el cambio de interacción observado para la combinatoria TOA+MG132 en presencia de VPA+VCR subletal, podría deberse a que la presencia de

estas últimas es capaz de interferir con el recambio mitocondrial que pone en juego la línea Raji y que culmina con la eliminación de las mitocondrias dañadas. De esta manera el efecto de VPA+VCR estaría anulando este mecanismo de respuesta al estrés puesto en juego por la célula, ya que la interferencia conduciría a una acumulación progresiva de mitocondrias dañadas con resultado letal.

Para corroborar esta idea, efectuamos ensayos de determinación de masa mitocondrial y PMM mediante citometría de flujo utilizando NAO y TMRE respectivamente, en la línea Raji tratada con TOA, MG132 y TOA+MG132 en presencia y ausencia de VPA+VCR subletal.

En ausencia de VPA+VCR subletal, TOA, MG132 y la combinatoria TOA+MG132, disminuyeron la masa mitocondrial. Por el contrario, al co-tratar con VPA+VCR subletal, TOA, MG132 y la combinatoria TOA+MG132, aumentaron la masa mitocondrial (Fig. 3.50), confirmando que VPA+VCR efectivamente bloquea la respuesta de eliminación de mitocondrias que la línea Raji utiliza como forma de resistencia a los tratamientos individuales y combinados.

En cuanto al efecto sobre el PMM observamos que efectivamente TOA y TOA+MG132, logran generar niveles significativos de despolarización mitocondrial en presencia de VPA+VCR subletal (Fig. 3.51). Sin embargo, no se observaron cambios en el PMM con VPA+VCR solo, ni con MG132+VPA+VCR, ni con TOA +MG132 en ausencia de VPA+VCR (Fig. 3.51). Se realizaron también ensayos en donde el co-tratamiento se realizó solamente con VPA 3mM, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos ni con respecto al basal (datos no mostrados).

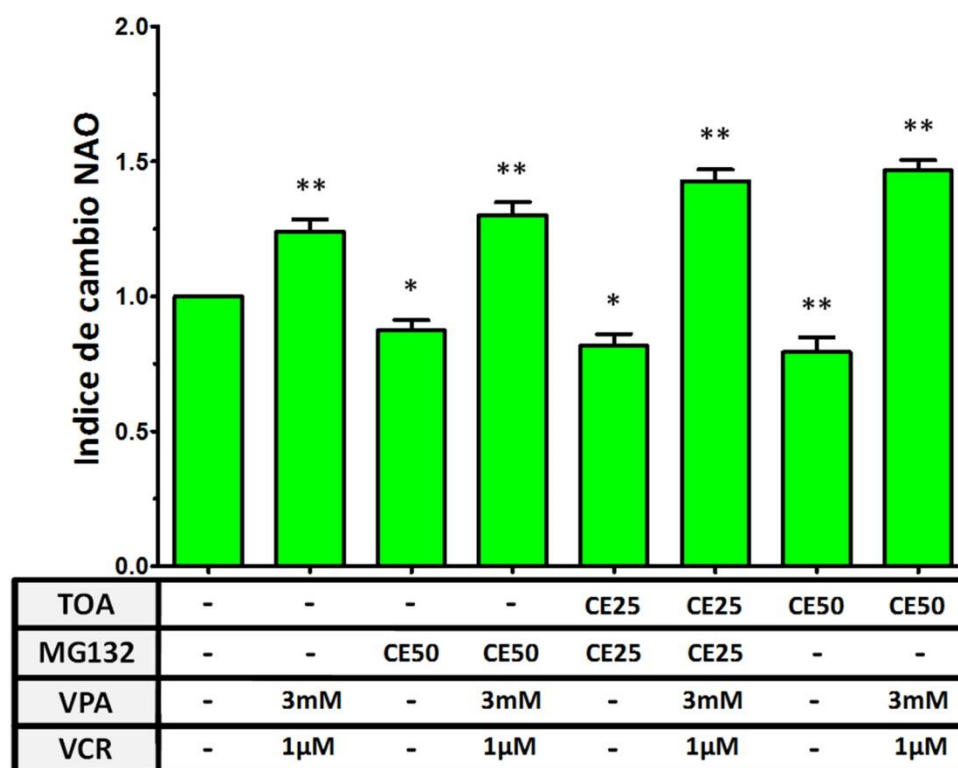


Figura 3.50. Cambios en la masa mitocondrial de la línea Raji en presencia y ausencia de VPA+VCR.

Las células se incubaron por 24hs con los tratamientos indicados. Posteriormente se marcaron con NAO y se evaluaron por citometría de flujo. El gráfico de barras muestra el índice de cambio para la MF del basal y los tratamientos, obtenido a partir de tres o más experimentos independientes (índice de cambio= MFtratamiento/MFbasal x 100). La presencia de diferencias significativas con respecto al basal se evaluó mediante el Test de Kruskal-Wallis seguida de un Post-Test de Dunn. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

El daño generado sobre la mitocondria por parte de TOA puede apreciarse en los aumentos del porcentaje de células con colapso total de PMM (Fig. 3.51, gráfico superior). También es evidencia del daño la caída de la mediana de fluorescencia de aquellas células que se consideran TMRE positivas, lo que se interpreta como un compromiso y reducción del PMM, en lugar de un colapso total (Fig. 3.51, gráfico inferior).

A pesar del incremento en el porcentaje de células con colapso de PMM no se observaron niveles significativos de muerte a 24hs (datos no mostrados). En el caso del tratamiento individual con

MG132, no se observó un efecto sobre el PMM en ningún caso (Fig. 3.51) y este fenómeno guarda cierta lógica si se tiene en cuenta que este compuesto no tiene a la mitocondria como blanco celular. En concordancia con este último punto cabe recordar que este tratamiento fue incapaz de generar niveles significativos de $O_2^{\cdot-}$ no solo en la línea Raji, sino también en U937.

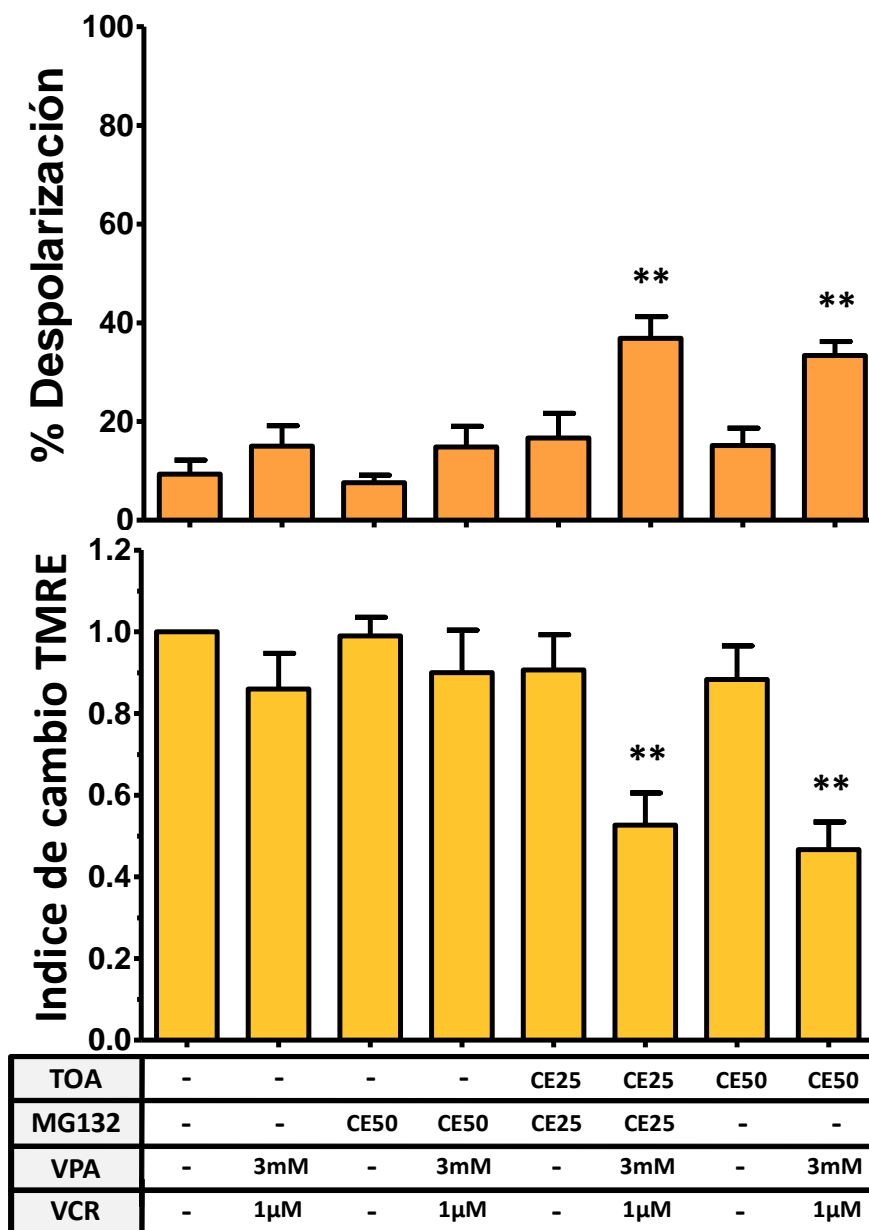


Figura 3.51. Pérdida de PMM inducida por TOA en presencia de VPA+VCR. Las células Raji se incubaron por 24hs con los tratamientos indicados. Posteriormente se marcaron con TMRE y se evaluaron por citometría de flujo. El gráfico de barras superior muestra el % de células con PMM colapsado. El gráfico inferior muestra el índice de cambio para la MF del basal y los tratamientos, obtenido a partir de tres o más experimentos independientes (índice de cambio= MF tratamiento/MF basal x 100). Las barras muestran la media de índice de cambio obtenida \pm DS. La presencia de diferencias significativas con respecto al basal, se evaluó mediante el Test de Kruskal-Wallis seguido de un Post-Test de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Con esta serie de ensayos logramos explicar la ausencia de mitocondrias despolarizadas en la línea Raji luego del tratamiento con TOA o TOA+MG132 y la reducción de la potencia citotóxica de la combinatoria demostrada en el antagonismo. Al bloquear la eliminación de mitocondrias la potencia relativa de TOA y MG132 combinadas, se incrementó en lugar de reducirse y esto se reflejó en el sinergismo demostrado.

En resumen, el tratamiento de la línea Raji con TOA+MG132 a pesar de generar niveles significativos de Anión Superóxido y una reducción importante del contenido de GSH mostró una interacción de tipo antagónica lo que se traduce en una menor capacidad de ejercer citotoxicidad sobre estas células. Además, se demostró que la línea Raji tenía silenciado el gen de la proteína BNIP3 (factor importante en la muerte mediada por TOA) y que la presencia los tratamientos indujeron altos niveles de autofagia. Supusimos entonces que estos eran los mecanismos de resistencia que las células ponían en juego para evadir la muerte mediada por TOA. Este antagonismo se pudo revertir mediante el co-tratamiento con dosis subletales de VPA que permite la expresión de BNIP3 y VCR que bloquea el flujo autofágico pero no al co-tratar con cualquiera de estas drogas por separado.

Por otro lado, el antagonismo TOA+MG132 en Raji se asoció también a la ausencia de despolarización mitocondrial, siendo esto un dato relevante ya que el principal blanco celular del TOA es la mitocondria. Además se observó que como consecuencia del tratamiento se generaba una disminución de la MM y que las mitocondrias se ubicaban alrededor del núcleo dando lugar a una distribución compatible con la presencia de un CPNM. Esta serie de observaciones nos llevó a pensar que para evitar el daño generado por TOA, las células de la línea Raji eliminaban las mitocondrias dañadas por esta droga, evitando así la acumulación de mitocondrias dañadas y por lo tanto la inducción de muerte a expensas de reducir la masa mitocondrial. Al exponer a las células a TOA+MG132 en presencia del co-tratamiento con VPA+VCR se observó un aumento de la MM, una desorganización del CMP y un aumento significativo de células que presentaban despolarización

mitocondrial, en conjunto un efecto similar al que se observa en la línea U937 al ser tratada con TOA o TOA+MG132. Esto puede deberse a que la eliminación de las mitocondrias dañadas en células Raji ocurra a través del proceso autofágico (mitofagia) por lo que el agregado de un bloqueante de las etapas tardías del proceso como la VCR impediría esta vía de escape a la muerte inducida por TOA.

3.5.5 Eliminación selectiva de mitocondrias por autofagia y control de calidad mitocondrial

La red mitocondrial está controlada tanto en el número de unidades que la conforman como en su distribución, de manera que pueda atender las demandas metabólicas de la célula. El incremento de mitocondrias ocurre por medio de un complejo proceso denominado biogénesis mitocondrial que tiene lugar en las zonas perinucleares. La eliminación de mitocondrias ocurre por una forma selectiva de autofagia que se denomina mitofagia. El balance entre biogénesis y mitofagia determina la masa mitocondrial y se define como recambio mitocondrial (*mitochondrial turnover*). Este recambio tiene un rol importante en el control de calidad mitocondrial. Las células pueden identificar las mitocondrias dañadas, eliminarlas por mitofagia y eventualmente reemplazarlas por mitocondrias nuevas mediante biogénesis mitocondrial. Es decir que la inducción de mitofagia conlleva dos hechos importantes: la carga de mitocondrias en los autofagosomas para su eliminación degradativa en los lisosomas, y un resultado neto de reducción de la masa mitocondrial.

Al interrumpir el flujo autofágico asociado a la degradación de mitocondrias (flujo mitofágico), ocurre un incremento en la masa mitocondrial, el cual puede ser aún mayor si existen niveles elevados de biogénesis mitocondrial. Es decir que además de observar un incremento de autofagosomas con mitocondrias, en el caso de la mitofagia es posible evaluar el impacto directo en la masa de organelas que son objeto de degradación autofágica.

En resumen, para identificar mitofagia debemos detectar un incremento de la masa mitocondrial con un bloqueante del flujo mitofagico en la fase tardía. Esto es precisamente lo que observamos al tratar las células Raji con VCR. Pero además debemos encontrar evidencias de colocalización de autofagosomas y mitocondria.

Para verificar la presencia de autofagosomas asociados a mitocondrias en las células tratadas con VPA y VCR, realizamos una evaluación por microscopía de fluorescencia en células marcadas con MTKred y MDC (Figs. 3.52 y 3.53). En el caso de las células Raji tratadas con VPA 3mM, se observó un aumento en la correlación de la fluorescencia de MTKred y MDC con respecto al estado basal. El

incremento en la correlación fue aún mayor en el caso de VPA+VCR. Esto se evidencia por la superposición de las marcas fluorescentes roja y verde (Fig. 3.52 Merge), y por un incremento en el número de píxeles con valores similares verde y rojo (densidad de puntos cercanos a la recta diagonal rojo=verde) (Fig. 3.52 correlación rojo/verde). Por el contrario, en la línea U937 no se observó colocalización en ninguno de los tratamientos, dado que no se observó correlación entre la fluorescencia de MTKred y MDC, (densidad de píxeles en áreas cercanas a la diagonal verde=rojo) (Fig. 3.53). Además, en este caso las imágenes superpuestas prácticamente no mostraron coincidencia de la marca de MTKred y MDC (Fig. 3.53 Merge). Este comportamiento en la línea U937, confirma que estas células no ponen en juego la eliminación de mitocondrias dañadas como mecanismo de resistencia. Por último observamos que la inmunomarcación de BNIP3 en células Raji colocaliza con la marca de mitocondrias realizada con MTKred (Fig. 3.54), indicando que la expresión de BNIP3 inducida por VPA es efectivamente de localización mitocondrial.

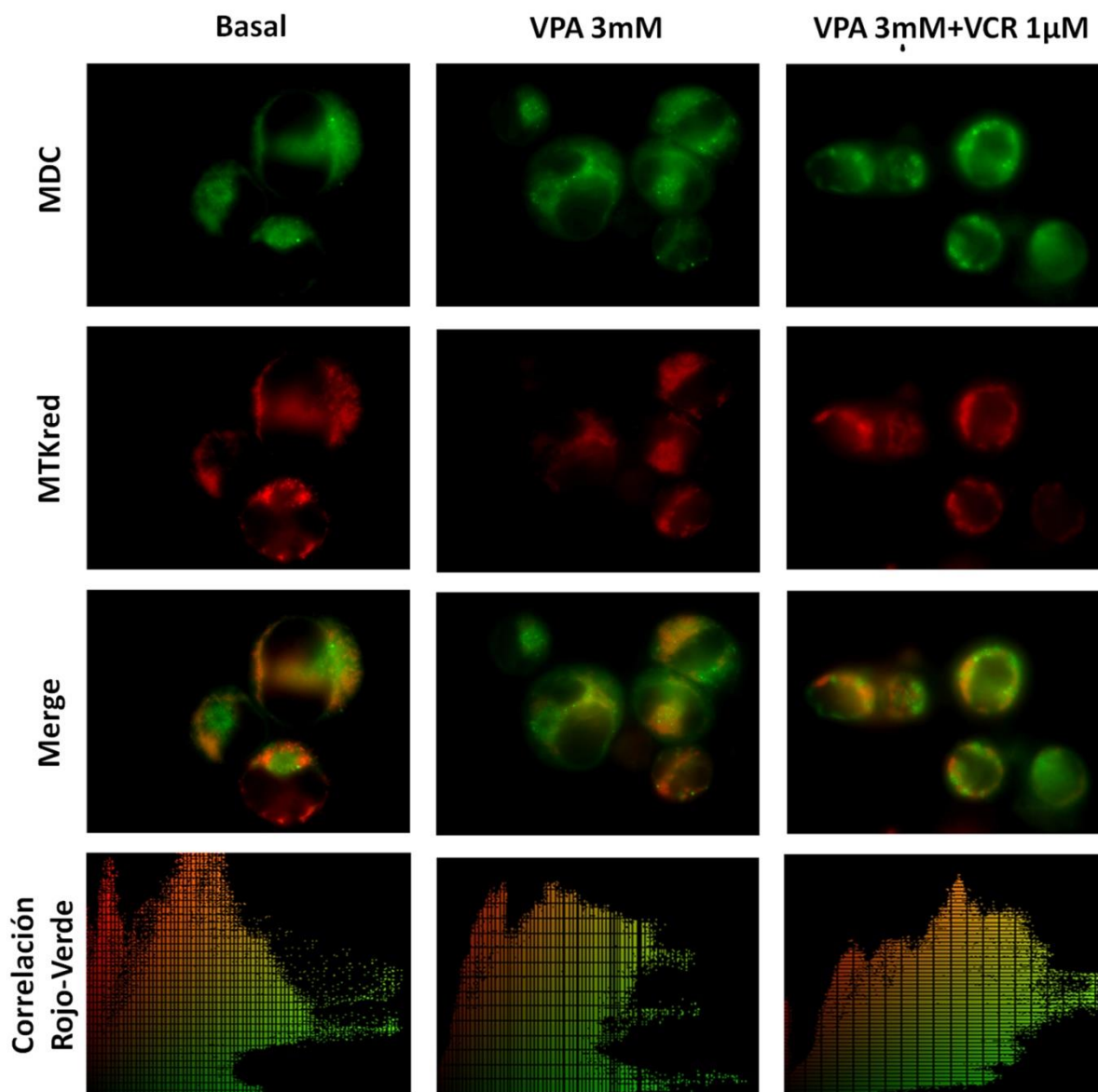


Figura 3.52. Análisis de colocalización entre autofagosomas y mitocondrias en la línea Raji. Las células Raji fueron tratadas según se indica por 24hs, y luego se marcaron con MTKred y MDC. Las imágenes de fluorescencia azul (MDC) y roja (MTKred) se analizaron en búsqueda de colocalización utilizando pseudocolores y un análisis de correlación verde vs rojo (Image-Pro Plus 6.0). Se realizaron controles de marcación simple para constatar la ausencia de señal cruzada entre ambas sondas. En las muestras que solo se marcaron con MTKred, no se detectó señal en los canales rojo y azul utilizando un filtro UV 330-385nm U-MWU2. En muestras marcadas sólo con MDC no se detectó fluorescencia en el canal rojo utilizando un filtro U-MWG2 510-550nm (resultados no mostrados).

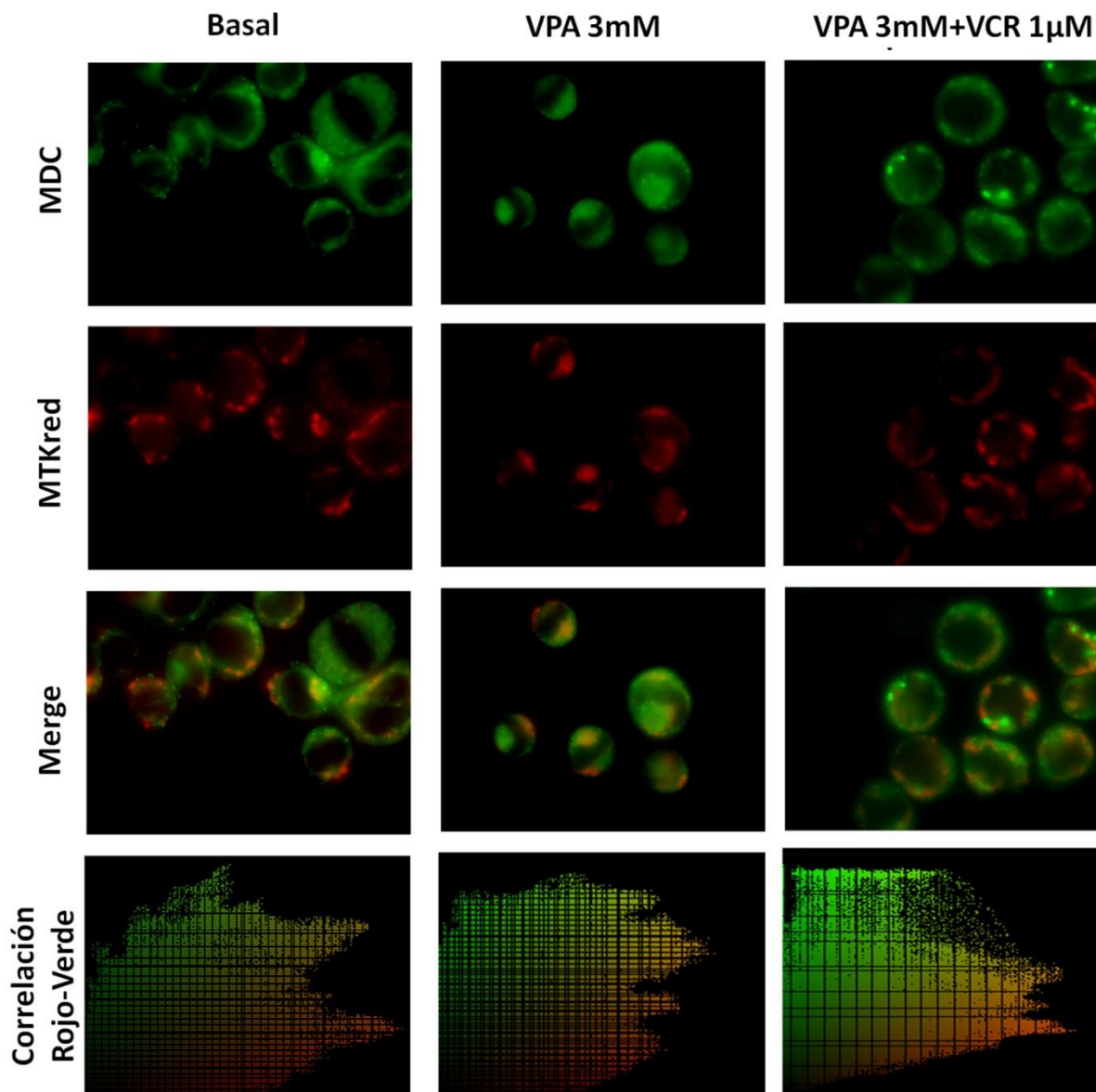


Figura 3.53. Análisis de colocación entre autofagosomas y mitocondrias en la línea U937. Las células U937 fueron tratadas según se indica por 24hs, y luego se marcaron con MTKred y MDC. Las imágenes de fluorescencia azul (MDC) y roja (MTKred) se analizaron en búsqueda de colocación utilizando pseudocolores y un análisis de correlación verde vs rojo (Image-Pro Plus 6.0). Se realizaron controles de marcación simple para constatar la ausencia de señal cruzada entre ambas sondas de la misma manera que se especifica en la Fig. 3.52.

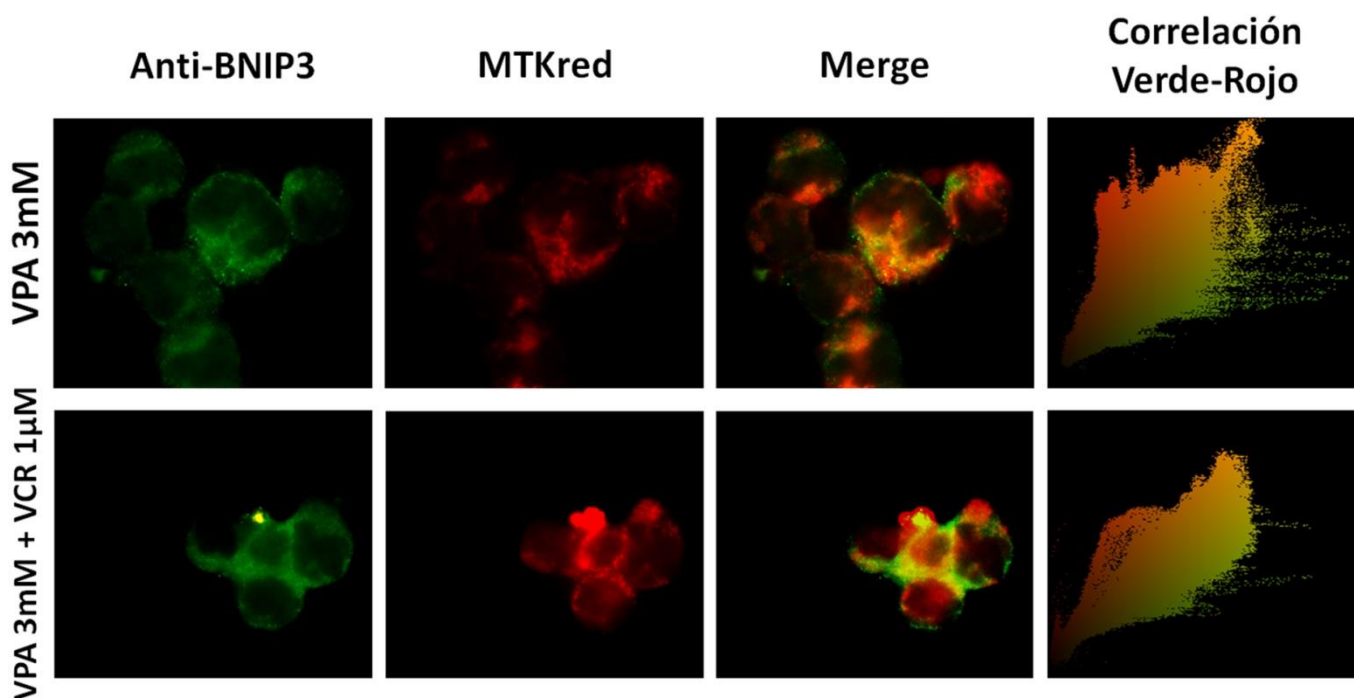


Figura 3.54. Colocalización entre BNIP3 y mitocondrias en células Raji. Las células Raji se trataron durante 24hs con VPA 3mM y VPA 3mM+VCR 1µM de manera de inducir la expresión de BNIP3. Las células se marcaron con MTKred, luego se fijaron y permeabilizaron para una posterior marcación con anti-BNIP3 y un anticuerpo secundario marcado con FITC. Se analizó la existencia de colocalización utilizando pseudocolores y un análisis de correlación Verde-Rojo (Image-Pro Plus 6.0). En las imágenes superpuestas (Merge) las áreas de colocalización aparecen de color amarillo/naranja

3.6 Evaluación de la interacción de fármacos citotóxicos en células de pacientes con neoplasias hematológicas

Hasta aquí hemos demostrado que a partir del estudio del tipo de interacción observada entre las drogas de un tratamiento combinado, es posible no sólo determinar la efectividad de esa combinatoria para ejercer un efecto dado, sino que también este tipo de estudios pueden ayudar a comprender y/o identificar los diferentes mecanismos de respuesta al estrés, que la célula tumoral pone en juego frente a un tratamiento en particular.

El TOA es un fármaco utilizado clínicamente en leucemia promielocítica y estas células son particularmente sensibles a los efectos del TOA. Sin embargo la potencia citotóxica del TOA es reducida en otras neoplasias oncohematológicas, como es el caso de la leucemia promonocítica (M4 de la clasificación FAB).

En nuestro estudio, la potencia relativa del TOA pudo ser incrementada por combinación con MG132 y con VPA en células U937, que provienen de una leucemia promonocítica (M4). Es decir que el potencial terapéutico del TOA se incrementa por combinaciones de este tipo, ya que podrían sensibilizar a los blastos leucémicos al efecto citotóxico, para alcanzar así el objetivo de remisión de la enfermedad.

Por otra parte, la potencia relativa de TOA+MG132 fue reducida en el caso de las células Raji que corresponden a un linfoma de Burkitt, pero pudimos incrementarla sustancialmente por bloqueo de la mitofagia con VCR junto al uso de la droga epigenética VPA. La presencia de mitofagia y silenciamiento epigenético de BNIP3, podría ser una característica particular de ciertas neoplasias B agresivas como es el caso del linfoma de Burkitt, el linfoma difuso de células B grandes, o las transformaciones de Richter que ocurren en la progresión de la leucemia linfática crónica (LLC). De acuerdo a la literatura, la resistencia por silenciamiento epigenético de BNIP3 y mitofagia, podría asociarse a las formas agresivas de otras neoplasias, incluyendo leucemias y linfomas. Es por eso que el bloqueo de mitofagia por fármacos como la VCR y el tratamiento epigenético con fármacos como el VPA, podría cambiar radicalmente la potencia de los fármacos citotóxicos en estas neoplasias agresivas.

Surge entonces el interrogante de si es posible demostrar este efecto sensibilizante de las combinaciones de fármacos que hemos estudiado en las líneas celulares U937 y Raji, en células neoplásicas obtenidas de pacientes con patologías relacionadas.

Con tal fin, a continuación presentaremos tres casos en los que fue factible aplicar un estudio similar al realizado sobre las líneas U937 y Raji sobre muestras provenientes de pacientes con diferentes patologías oncohematológicas. Buscamos no solo determinar la sensibilidad de las células provenientes de pacientes a la combinatoria TOA+MG132, sino también evaluar la influencia del co-tratamiento con VPA+VCR sobre la respuesta frente a la combinatoria. De esta manera buscamos evidenciar la relevancia del mecanismo de respuesta a través de mitofagia observado en la línea Raji, en otros tipos de leucemias.

Para esto evaluamos un caso de eritroleucemia (FAB M6) en la que analizamos el efecto de TOA y VPA, para compararlo con los efectos de la combinación TOA+VPA en células U937. En segundo lugar evaluamos el efecto sensibilizante de VPA y VCR sobre la combinación TOA+MG132, en un caso clínico de leucemia T del adulto y en un caso de LLC.

3.6.1 Caso 1 - leucemia mieloide aguda (FAB M6)

Corresponde al estudio de la respuesta a la combinación TOA+VPA en células de sangre periférica de un paciente diagnosticado con una leucemia mieloide aguda, correspondiente a la clase M6 (eritroleucemia), el cual presentaba un alto porcentaje de blastos circulantes (mayor a 60%). En esta ocasión, la combinatoria se comportó de manera sinérgica a niveles de efecto altos (de manera similar a lo que ocurre con la línea U937), mientras que a bajos niveles de citotoxicidad resultó antagónica (Fig. 3.56A). Podemos decir entonces, que la potencia citotóxica del TOA se ve incrementada por la combinación con VPA, siendo mayor este incremento a niveles altos de efecto (curva CI vs efecto inclinada hacia abajo). Esto indica que la intensidad y efectividad de las respuestas de stress que se oponen al efecto citotóxico, decrecen como consecuencia del incremento en la concentración de los fármacos combinados (Fig. 3.56A). Por otra parte, en presencia de una baja dosis de VCR que no indujo niveles apreciables de citotoxicidad por sí sola, el sinergismo TOA+VPA se hizo evidente a partir de niveles de efecto menores (Fig. 3.56B). Esto indica que VCR estaría bloqueando la resistencia al TOA aun en los niveles de efecto más bajos, contribuyendo a multiplicar su potencia citotóxica.

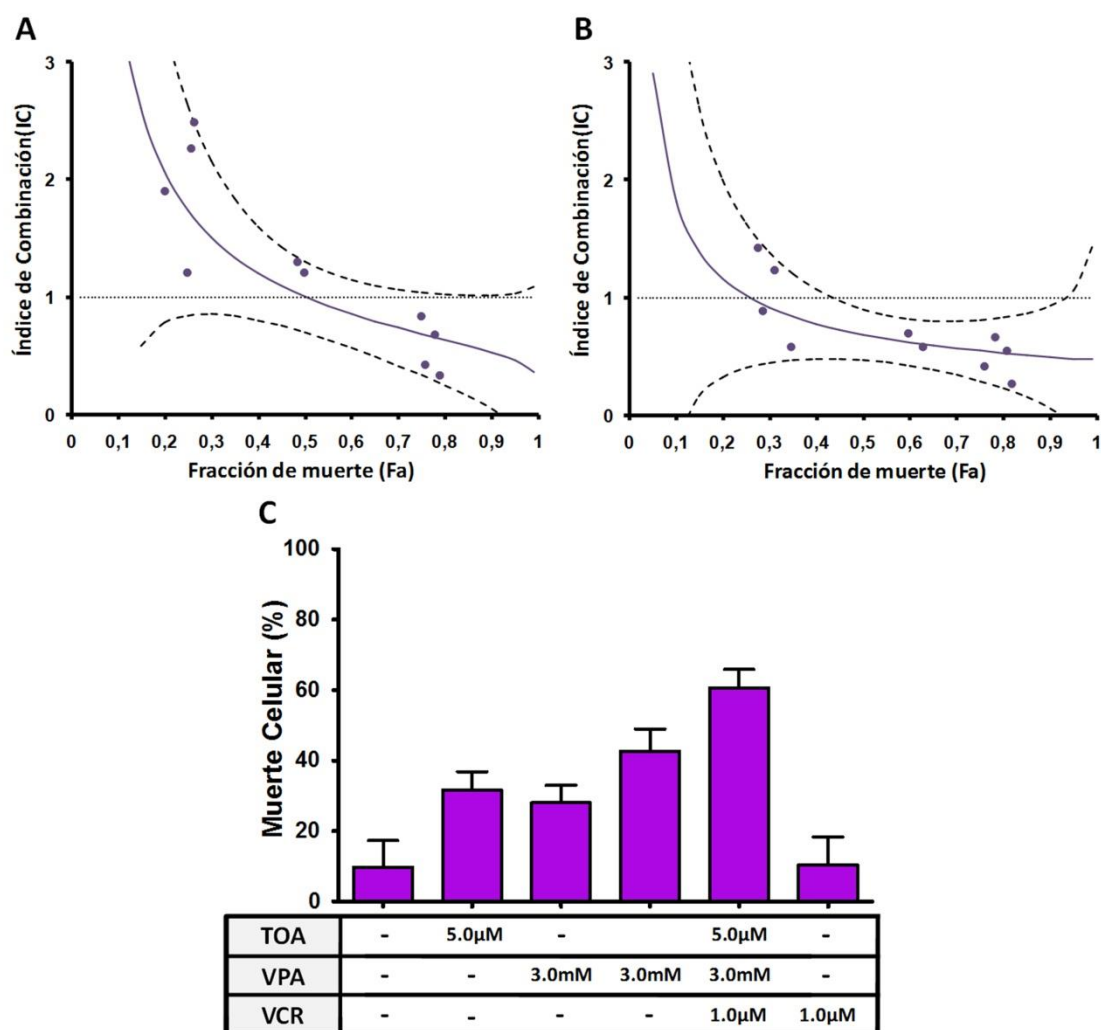


Figura 3.56. Sinergismo TOA+VPA en células de un paciente con Eritroleucemia. Se muestran gráficos de CI en función del nivel de efecto citotóxico, correspondiente a células de sangre periférica de un paciente con Linfoma T tratadas con TOA+VPA en ausencia (A) y presencia (B) de VCR 1μM. Se muestran los datos experimentales (puntos) y la curva calculada a partir de los mismos (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas). Se observa una interacción de tipo sinérgica que se hace más evidente en presencia de VCR. En (C), se muestra con propósito ilustrativo, un mayor detalle de los resultados de efecto citotóxico obtenidos para uno de los puntos experimentales evaluados para determinar el CI (la barras corresponden a \pm SD obtenido para los triplicados).

3.6.2 Caso 2 - Linfoma de células T del adulto

Corresponde a los resultados obtenidos cuando se aplicó un estudio similar al desarrollado hasta aquí sobre células de sangre periférica de un paciente diagnosticado con un Linfoma de células T del adulto asociado a infección con HTLV-1. El paciente se encontraba bajo tratamiento paliativo luego de responder de manera deficiente al tratamiento con Peg-Interferon alfa2b. En este caso las células fueron tratadas por triplicado con un amplio rango de dosis de TOA, MG132 y TOA+MG132 en relación molar fija. De esta manera se determinó que la interacción de TOA y MG132 era fuertemente antagónica (Fig. 3.57A). Luego se evaluó el efecto de dosis bajas de VPA y VCR (1 μ M y 3 mM respectivamente). Estas concentraciones no tuvieron efecto citotóxico per se. Luego evaluamos la interacción de TOA y MG132 en presencia de 1 μ M VCR y 3 mM VPA, observando que ahora la interacción era fuertemente sinérgica (Fig. 3.57B). En este caso el cambio de interacción alcanzado, pasando de un fuerte antagonismo a un fuerte sinergismo, resultó ser mucho más notable que en el caso experimental observado en la línea Raji. Puede observarse que la CE50 de TOA+MG132 se redujo más de 10 veces, o dicho en otros términos la potencia relativa de TOA+MG132 se multiplicó por 10. Esto indica que la incorporación de VCR y VPA en dosis subletales, anula la capacidad de estas células neoplásicas de responder al stress citotóxico de TOA y MG132 (Fig. 3.57).

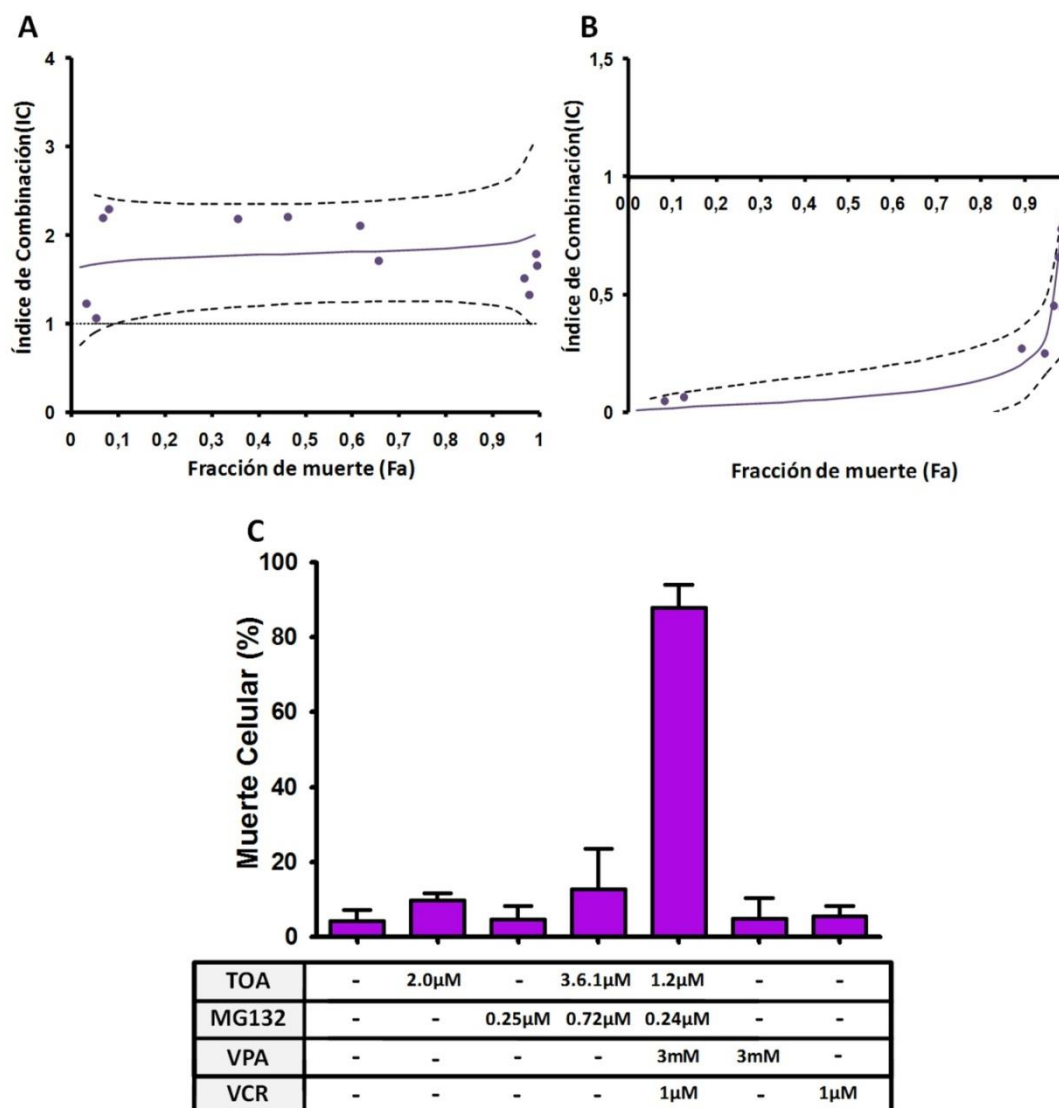


Figura 3.57. Cambios en el tipo de interacción TOA+MG132 en presencia de VPA+VCR en un Linfoma de Células T. Se muestran gráficos de CI en función del nivel de efecto citotóxico, correspondiente a células de sangre periférica de un paciente con Linfoma T tratadas con TOA+MG132 en ausencia (A) y presencia (B) de VPA 3mM y VCR 1μM. Se muestran los datos experimentales (puntos) y la curva calculada a partir de los mismos (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas). Se observa cambio de interacción que pasa de antagonista a sinérgica en presencia de VPA+VCR. En (C), se muestra con propósito ilustrativo, un mayor detalle de los resultados de efecto citotóxico obtenidos para uno

de los puntos experimentales evaluados para determinar el CI (la barras corresponden a \pm SD obtenido para los triplicados).

3.6.3 Caso 3 – Leucemia linfática crónica

Corresponde al estudio de un paciente de 74 años diagnosticado con una LLC tipo B atípica y gran porcentaje (mayor a 95%) de células de estirpe linfoide en circulación. Las células de sangre periférica obtenidas del paciente se sometieron a tratamiento por 72hs con TOA, MG132 y la combinatoria TOA+MG132, en ausencia y presencia de VPA 1mM+VCR 1 μ M. En este caso, la combinatoria TOA+MG132 mostró un comportamiento de tipo antagónico, pero pudo revertirse a sinergismo en presencia de VPA+VCR (de manera similar a lo que ocurre con la línea Raji y al Caso 2 presentado en esta sección). En este caso, el valor de la CE50 de TOA+MG132 se redujo alrededor de 8 veces en presencia de VPA 1mM+VCR 1 μ M. Cabe aclarar que en este caso VPA a una concentración de 3mM fue capaz de generar por si solo niveles apreciables (aunque bajos) de muerte celular.

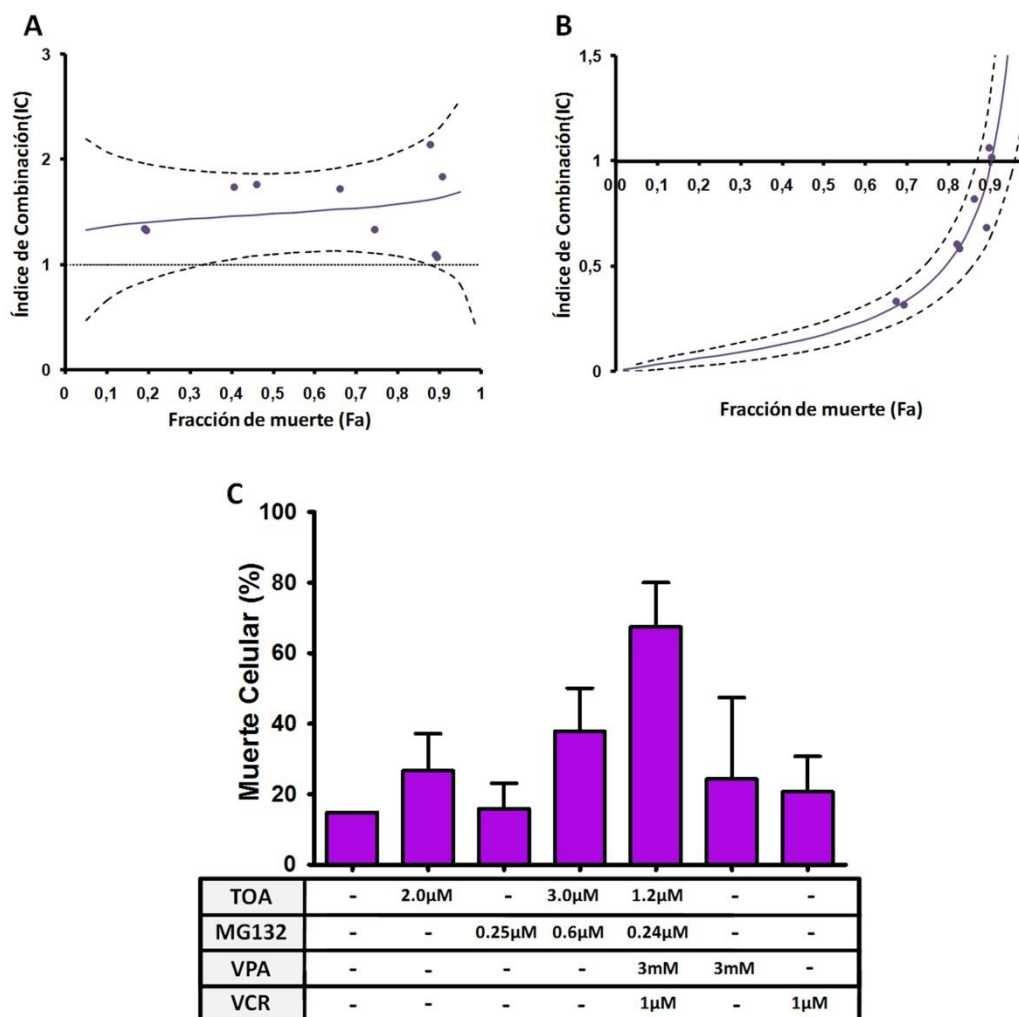


Figura 3.58. Cambios en el tipo de interacción TOA+MG132 en presencia de VPA+VCR en un caso de LLC. Se muestran gráficos de CI en función del nivel de efecto citotóxico, correspondiente a células de sangre periférica de un paciente con LLC de tipo B con TOA+MG132 en ausencia (A) y presencia (B) de VPA 3mM y VCR 1 μ M. Se muestran los datos experimentales (puntos) y la curva calculada a partir de los mismos (línea llena) con sus correspondientes intervalos de confianza de 95% (líneas punteadas). Se observa cambio de interacción que pasa de antagonista a sinérgica en presencia de VPA+VCR. En (C), se muestra con propósito ilustrativo, un mayor detalle de los resultados de efecto citotóxico obtenidos para uno de los puntos experimentales evaluados para determinar el CI (la barras corresponden a \pm SD obtenido para los triplicados).

4 Discusión

4.1 Acerca de la potencia citotóxica relativa y los mecanismos de resistencia a fármacos citotóxicos

4.1.1 La curva dosis respuesta (CDR) como evaluación de potencia citotóxica: balance entre los factores que inducen muerte celular y las respuestas de estrés celular que promueven la supervivencia

Las células eucariotas poseen mecanismos activos y homeostáticos de autopreservación y tienden a sobrevivir frente a diferentes formas de injuria que pueda afectarlas. Estas respuestas de estrés operan de manera concurrente y en forma interrelacionada. Cuando la injuria celular alcanza un grado suficientemente elevado, las respuestas de estrés ya no logran contener el daño ejercido, ocurriendo entonces la muerte celular. La muerte celular en este caso, ocurre de una manera activa, bajo el principio de preservación del resto del tejido en un marco homeostático y programado. Recientemente se ha enfatizado en denominar muerte regulada a este tipo de respuesta. Es decir que la muerte celular regulada ocurre frente a un estímulo extemporáneo, lo suficientemente intenso para que sean superadas las respuestas de estrés celular. Por otra parte, el término muerte programada, se reserva para aquellas formas de muerte celular activa que ocurren en contextos fisiológicos como el desarrollo embrionario o la ontogenia inmune. En estos casos la muerte programada no ocurre frente a noxas imprevistas. De allí que se haya propuesto establecer una denominación diferente para la muerte programada y la muerte regulada.

El concepto de muerte regulada y su ocurrencia cuando una noxa supera un determinado umbral, doblendo las respuestas de supervivencia, es especialmente aplicable a los estudios de potencia citotóxica de fármacos. El concepto de muerte celular regulada es claramente aplicable a células cancerosas tratadas con fármacos citotóxicos, en donde podemos evaluar experimentalmente y de manera controlada, el balance entre intensidad de la noxa y respuestas de estrés celular que promueven la supervivencia.

En este trabajo evaluamos muerte celular en función de la dosis de fármacos citotóxicos mediante citometría de flujo. La posibilidad de evaluar célula por célula la ocurrencia de muerte, nos ha permitido utilizar un modelo cuántico (o cuantal) dosis-respuesta. Esto nos permitió construir curvas dosis respuesta obtenidas con un modelo probabilístico basado en la distribución logística.

Así la potencia citotóxica queda caracterizada en todo el rango de dosis, aunque nos focalizamos en el intervalo en el que los incrementos de dosis producen aumento del efecto. Esta función nos permite calcular la probabilidad de muerte celular para una dosis determinada, a la vez que utilizando la función inversa podemos estimar la dosis que es necesario utilizar para alcanzar un determinado nivel de efecto.

Por ejemplo la CE50 de TOA a 72hs en células Raji fue 10 μ M, indicando que esta concentración de TOA producirá la muerte en el 50% de las células Raji a las 72hs. Es posible también obtener una medida de riesgo relativo (RR) asociado a cada dosis de TOA. Para la dosis CE50 de TOA es tan probable encontrar una célula muerta como una célula viva, ya que la fracción $F_a=(1-F_a)=0.5$ y entonces el $RR=0.5/0.5=1.0$. En síntesis, la CDR nos provee una caracterización completa de la potencia citotóxica del fármaco evaluado.

La intensidad de la noxa es dependiente entonces de la concentración o dosis de la droga, mientras que la fracción de células muertas para cada dosis nos indica la probabilidad de que se inicie el programa de muerte activa. Lo que hemos definido como CE50 es una intensidad de la noxa que logra iniciar la muerte regulada en el 50% de las células. Claramente en los rangos de efectos bajos como la CE25, es esperable encontrar a las respuestas de estrés en sus formas más floridas, en el 75% de células viables que aún no han iniciado la muerte regulada. En cambio en una dosis CE75, la probabilidad de observar muerte regulada alcanza un 75%, y en este caso las respuestas de estrés han sido claramente superadas.

Nos referimos a la potencia citotóxica como la concentración necesaria de una droga para alcanzar un nivel determinado de efecto de muerte celular. Por ejemplo para el nivel de efecto 50% del TOA, expresamos la potencia como una concentración CE50. Cuando observamos que se logra el mismo efecto con una menor concentración, nos enfrentamos a un incremento de la potencia citotóxica del TOA. Por el contrario, si se requiere una mayor concentración de TOA para alcanzar un 50% de muerte celular, nos enfrentamos a una caída en la potencia citotóxica. Claramente los cambios en la potencia citotóxica del TOA, están influenciados por las respuestas de estrés celular que las células neoplásicas ponen en marcha, para oponerse a la injuria que les significa la exposición a TOA.

4.1.2 Resistencia, sensibilidad y potencia citotóxica evaluada mediante la CDR

Nuestro modelo de estudio nos permite y en realidad nos obliga a resaltar un aspecto que consideramos esencial: es posible alcanzar una intensidad de la noxa o concentración suficiente de TOA como para iniciar la muerte celular en el 50% de la población celular en estudio, independientemente de que la población sea sensible o resistente al TOA. Sin embargo en el caso de la población resistente, la CE50 será necesariamente superior a la CE50 de la población sensible.

Por ejemplo, en células de leucemia promielocítica la respuesta celular al estrés oxidativo es sumamente deficiente, en comparación con otras leucemias como es el caso de leucemia promonocítica. La sensibilidad de las células de leucemia promielocítica, se traduce en una CE50 de TOA inferior a la observada en leucemia promonocítica. Dicho en otros términos, la potencia del TOA es inferior en leucemia promonocítica al compararla con la leucemia promielocítica.

Es importante notar, que en la progresión tumoral, las respuestas de estrés celular se vuelven más y más importantes para asegurar la sobrevivencia de las células neoplásicas en condiciones sumamente adversas. Esta activación de las respuestas de estrés ocurre tanto por condiciones intracelulares particulares, como es el caso de la producción anormal de niveles elevados de ERO, como así también por condiciones microambientales particulares como la hipoxia, durante el crecimiento en regiones de pobre vascularización. Esta profusión de respuestas de estrés celular, redundan en una mayor tolerancia a los fármacos antineoplásicos, lo que se manifiesta por una reducción en la potencia citotóxica. Es necesario entonces aplicar una mayor concentración de droga citotóxica para alcanzar el mismo efecto.

4.1.3 Potencia citotóxica y selectividad: la importancia para las terapias dirigidas y combinadas

Otro concepto importante asociado a la potencia citotóxica es la selectividad. La potencia de un fármaco como el TOA debe ser muy alta para las células neoplásicas en comparación con las células normales. De no ser así, se generarían serios efectos adversos como las arritmias cardíacas al intentar alcanzar el efecto de muerte celular neoplásica. Es decir que el fortalecimiento de las respuestas de estrés que promueven la supervivencia de las células neoplásicas, disminuyen la potencia y también la selectividad de los fármacos citotóxicos.

Nuestro modelo de estudio nos lleva a resaltar otro aspecto, derivado del balance entre factores promotores de la supervivencia y la injuria proporcionada por los fármacos antineoplásicos, que en particular observamos en las concentraciones cercanas a la CE50. La injuria per se muy raramente es selectiva. En cambio las respuestas de estrés que se desarrollan de manera anormal y exagerada en las células neoplásicas, conducen a verdaderas adicciones del tejido tumoral, que las hace diferentes a las células normales. De esta manera, al inhibir estas respuestas de estrés, es posible incrementar no sólo la potencia, sino además la selectividad de drogas citotóxicas como el TOA. El diseño de terapias combinadas busca precisamente incrementar la potencia citotóxica y la selectividad.

4.1.4 Estudio de la potencia citotóxica en combinaciones de fármacos

Nuestro modelo de estudio se aplicó a la evaluación de una CDR obtenida como resultado de la exposición a dos fármacos citotóxicos de manera simultánea (TOA y MG132 por ejemplo). Una parte del efecto observado se explica por el TOA y otra por el MG132. En este caso la potencia de TOA parece aumentar ya que con la mitad de la dosis se logra el mismo efecto. Lo mismo ocurre con MG132 ya que la mitad de la dosis produce el mismo efecto. Pero ese aumento de potencia no es genuino para ninguno de los dos fármacos ya que se complementan mutuamente. El índice de combinación es definido como:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{1}{(DRI)_1} + \frac{1}{(DRI)_2}$$

, donde para el caso de nuestro estudio (D)1 corresponde a la dosis de TOA que produce un nivel de efecto x en la combinación, (D)2 es la dosis de MG132 que produce un nivel de efecto x en la combinación, (Dx)1 y (Dx)2 son las dosis, de TOA y MG132 respectivamente, que producen un nivel de efecto x como drogas individuales, en tanto que (DRI)1 es el índice de reducción de dosis de TOA y (DRI)2 es el índice de reducción de dosis de MG132. En el índice de combinación se evalúa la relación entre dosis necesaria de TOA para alcanzar un efecto determinado en la combinación con MG132 y la dosis necesaria para alcanzar ese mismo nivel de efecto en forma individual. Por ejemplo CE50(TOA) en la combinación / CE50(TOA) como droga única. Lo mismo para MG132, CE50(MG132) en la combinatoria / CE50(MG132) como droga única. Es decir que se obtiene una potencia relativa

de TOA en la combinación respecto de la potencia como droga sola. Cuando existe aditividad la potencia relativa de TOA es 0.5 y la de MG132 es 0.5, con lo cual el CI es 1. En cambio cuando existe sinergismo la potencia relativa de TOA es mucho menor a 0.5 y lo mismo puede ocurrir con MG132. El resultado es que el CI es inferior a 1. La inversa de esta potencia relativa se denomina índice de reducción de dosis (DRI por *dose reduction index*). En el caso del sinergismo nos indica cuantas veces menos dosis se necesita para lograr el mismo efecto. Por ejemplo, la potencia relativa de TOA en la combinación con MG132, sobre células Raji, en el nivel de efecto 50% para la muerte celular a 72hs, fue 0.81 y la DRI fue 1.24 (la inversa de la potencia relativa). Cuando el valor de la potencia relativa en la combinatoria aumenta, el CI es superior a 1 y el DRI cae, indicando que se requiere más dosis para lograr el mismo efecto.

4.1.5 Cambios en la potencia relativa de fármacos combinados y respuestas de estrés celular

En nuestro modelo de estudio, analizamos la interacción entre dos fármacos citotóxicos, a fin de determinar los cambios en la potencia relativa. Toda vez que la potencia relativa decrece como consecuencia de la exposición combinada, hablamos formalmente de antagonismo, pero interpretamos además que esa condición favorece de alguna manera las respuestas de supervivencia. Esto nos permite luego indagar acerca de cuáles son esas respuestas que se oponen al efecto citotóxico, particularmente explorando el fenotipo celular en niveles de efecto CE50 o menores. Por el contrario, cuando la potencia relativa se incrementa por exposición combinada, hablamos de sinergismo, e interpretamos que hay una merma en la eficiencia de las respuestas de estrés celular. En ciertos casos, un fármaco puede estar dirigido únicamente a suprimir la respuesta de estrés a la cual es adicta la célula neoplásica, sin que tenga un efecto citotóxico per se. Hablamos en estos casos de sensibilización a los fármacos citotóxicos, ya que la potencia relativa de la droga citotóxica se incrementa por la sola presencia del fármaco sensibilizante.

4.2 Sinergismo y antagonismo entre TOA y MG132 en células U937: el rol de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y una respuesta protectora que incrementa el nivel de GSH

4.2.1 La producción de ERO en los mecanismos de muerte celular inducida por TOA

En los últimos años se han estudiado ampliamente los mecanismos de muerte celular inducida por arsénico en células leucémicas, proporcionando una base racional para lograr combinaciones sinérgicas, especialmente en terapias antileucémicas dirigidas a blancos celulares específicos. En muchos casos, el mecanismo de toxicidad del TOA en células leucémicas mieloides se relacionó a la producción de ERO, por acción de la enzima NADPH oxidasa, o debido al colapso del PMM (Chou *et al.*, 2005; Sumi *et al.*, 2010). Es lógico entonces que varios estudios sugirieran que el incremento en la producción de ERO, sería un factor que aumentaría la potencia citotóxica del TOA (Chou *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008a; Sumi *et al.*, 2010). Más concretamente, los fármacos con acción sobre las mitocondrias fueron sugeridos como los que tiene la mayor oportunidad de combinarse de manera sinérgica con el TOA, debido al incremento de ERO que acompaña al daño mitocondrial (Sanchez *et al.*, 2010).

4.2.2 El incremento de ERO no necesariamente se asocia a una mayor potencia citotóxica: en células U937 bajo $O_2^{\cdot-}$ se asocia a bajo GSH y sinergismo, alto $O_2^{\cdot-}$ se asocia a alto GSH y antagonismo

Tomando como antecedente las evidencias experimentales de estudios en células leucémicas, aportadas por numerosos trabajos previos de otros autores, realizamos la evaluación paralela de la producción de $O_2^{\cdot-}$ – debida a exposición a TOA, CAPE y MG132, y el resultado de la interacción de combinaciones de estos fármacos. Nuestra hipótesis consistía en que el sinergismo entre TOA y las otras drogas estaría asociado con la producción creciente de $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, contrastando esta hipótesis nuestros resultados demostraron que el sinergismo se asoció con disminución en la producción de $O_2^{\cdot-}$, mientras que fue el antagonismo el que se asoció con aumento de $O_2^{\cdot-}$. Por otra parte observamos que al agregar una concentración constante de H_2O_2 , lo suficientemente baja como para no tener efecto citotóxico, pero capaz de elevar el nivel de $O_2^{\cdot-}$, el sinergismo de TOA+MG132 se transformó en antagonismo sobre todo el rango de efecto. Es decir que los niveles de ERO elevados en el curso de los primeros tiempos de exposición, pueden reducir la potencia del TOA, en lugar de aumentarla como suponíamos en concordancia con la literatura predominante.

Cabe destacar que el mayor incremento en la producción de O_2^- intracelular, está estrechamente ligado a la producción aumentada de H_2O_2 por efecto de la dismutación espontánea o enzimática de O_2^- (Chen *et al.*, 2009). Por el contrario se ha demostrado que el H_2O_2 exógeno, puede pasar libremente a través de las membranas celulares, y de esa manera puede desencadenar la liberación de O_2^- intracelular a través de sistemas enzimáticos como la xantina oxidasa o ejerciendo daño sobre las mitocondrias (Carter *et al.*, 1994) En realidad, el aumento paralelo de producción de O_2^- intracelular como resultado de la exposición a dosis sub-citotóxicas de H_2O_2 , fue ya demostrada en varias líneas celulares, mediante el uso de la sonda fluorescente HE (Carter *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2009).

La observación de que la producción temprana de ERO podría proteger algunas células de la muerte celular inducida por TOA, fue menos frecuente en publicaciones anteriores, pero fue claramente demostrada en las células Raji en el trabajo realizado por Lu *et al.*, (Lu *et al.*, 2004). Estos autores encontraron que el H_2O_2 antagoniza los efectos de TOA en las células Raji. El antagonismo se revirtió por medio del inhibidor de PI3K wortmanina, proporcionando así una fuerte evidencia de que el aumento de H_2O_2 puede conducir a la estimulación de la vía de la PI3K, siendo ésta tal vez, una de las principales causas de la protección de la muerte celular inducida por TOA (Lu *et al.*, 2004). Se debe señalar que la inhibición de la PI3K, ha sido identificada como uno de las principales causas que llevan a la depleción de los niveles de glutatión. A su vez, la depleción de glutatión ha sido considerada un evento clave, referido por varios estudios que evaluaron sinergismo de TOA con diversos fármacos, incluyendo SP600125 (Ramos *et al.*, 2006), quercetina (Ramos *et al.*, 2008), LY294002 y wortmanina (Ramos *et al.*, 2005). Así, a pesar de la abundancia de evidencias bibliográficas acerca de que el incremento de ERO conduciría a un mayor sinergismo con TOA, el papel protector de la producción temprana de ERO demostrado por Lu *et al.*, parece ser fundamental en la interpretación de los resultados de nuestro estudio (Lu *et al.*, 2004).

Nuestro estudio ha demostrado que el sinergismo entre TOA y MG132 en células U937 en cuanto al efecto citotóxico, se asoció con bajos niveles GSH, mientras que el cambio abrupto hacia una interacción antagónica, producida por el agregado de bajas dosis de H_2O_2 , se asoció con mayores niveles de GSH. Es destacable que el incremento de GSH ocurre particularmente cuando se añade en dosis subletal a la combinación TOA + MG132.

Estudios de otros autores, han mostrado que la inhibición de NF- κ B también puede estar involucrada como parte de los mecanismos que explican el sinergismo entre TOA y MG132, posiblemente debido al bloqueo de la vía PI3K-AKT (Tabellini *et al.*, 2005). Gran parte de los efectos de los inhibidores del proteasoma, incluyendo el caso del fármaco extensamente estudiado Bortezomib, se han relacionado con la capacidad de interrumpir la vía de supervivencia de NF- κ B (Cavaliere *et al.*, 2009; Roccaro *et al.*, 2006; Zanotto-Filho *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que CAPE y MG132 son ambos inhibidores de NF- κ B, es posible plantear la hipótesis de que ambos fármacos tendrían la capacidad de interactuar de manera sinérgica con el TOA (Cavaliere *et al.*, 2009; Ortiz-Lazareno *et al.*, 2008). Sin embargo, sólo la combinación de TOA con MG132 se asoció con sinergismo, mientras que la combinación TOA+CAPE resultó en claro antagonismo en las líneas celulares U937 y Raji. Además, la combinación TOA+MG132 resultó en antagonismo en células Raji, en cuanto al efecto citotóxico. Ningún mecanismo por sí solo como la inhibición de NF- κ B, parece así anticipar la ocurrencia de una interacción sinérgica con TOA en un tipo celular determinado.

La interacción sinérgica entre TOA y el inhibidor de proteasoma Bortezomib, ha sido ya descrita en líneas celulares derivadas de leucemias mieloides, incluyendo las líneas K562 (Yan *et al.*, 2007) y HL60 (Sun *et al.*, 2007). Un estudio de Li *et al.*, que evaluó el xenoinjerto de células H60 en ratones *nude*, demostró que la combinación TOA+ Bortezomib, redujo el crecimiento del tumor, prolongó la supervivencia de los ratones, e indujo apoptosis de las células HL60, a la vez que demostró que el tratamiento combinado, tuvo una mejor respuesta que las drogas ensayadas de manera individual (Li *et al.*, 2007). Nuestro estudio es el primero, hasta donde hemos podido indagar en la literatura publicada, en demostrar la ocurrencia de sinergismo entre TOA y MG132 en células mieloides U937.

Hemos proporcionado una fuerte evidencia de que el incremento en la potencia citotóxica, que se observa al combinar TOA y el inhibidor del proteasoma MG132 en la línea U937, y que se demuestra por la ocurrencia de sinergismo en todo el rango de efectos, depende de la producción de bajos niveles de O₂⁻, en la etapa temprana posterior a la exposición de las drogas combinadas.

4.2.3 TOA y MG132 son sinérgicos en cuanto al efecto citotóxico y antagonistas en el efecto inhibitorio de la proliferación

El mecanismo de inhibición del crecimiento por TOA en células U937 ha sido estudiado en detalle por McCollum *et al.*, demostrando estos autores que TOA provoca un retardo en la progresión del ciclo celular, conduciendo a la apoptosis en la fase G₂/M del ciclo (McCollum *et al.*, 2005). Nuestro

estudio ha demostrado además, que la combinación TOA+MG132, produjo antagonismo sobre el efecto de inhibición de crecimiento celular en todos los niveles en células U937, indicando que el sinergismo de la combinación está restringido al efecto de inducción de muerte celular. Este hallazgo indica que pueden coexistir dos tipos de interacción opuestos (sinergismo y antagonismo), para la misma combinación de fármacos, pero considerando medidas de efecto diferentes (inhibición del crecimiento y muerte celular). Este resultado ilustra cuan complejo resultaría anticipar el efecto neto anti-leucémico de las drogas combinadas, si sólo se tuviera en cuenta la información sobre la presencia o ausencia de mecanismos de resistencia, identificados en estudios experimentales, como por ejemplo el incremento de GSH, la activación de NF- κ B, el retardo en la progresión del ciclo, o la producción de ERO.

4.3 TOA y MG132 son antagónicos en células Raji en cuanto al efecto citotóxico, pero la caída en la potencia relativa no puede explicarse por los niveles de GSH

4.3.1 TOA y MG132 reducen los niveles de GSH y aumentan $O_2^{\cdot-}$ en las células Raji

A diferencia de lo observado en la línea U937, la combinación de TOA y MG132 resultó antagónica en la línea Raji. Esto nos llevó a pensar que la presencia de los dos fármacos, estaba potenciando algunas respuestas compensadoras que se oponen al efecto citotóxico. En principio imaginamos que la producción de ERO tendría tal vez un rol, conduciendo a un incremento de GSH como habíamos observado en la línea U937. Sin embargo, nuestros resultados mostraban claramente, que a diferencia de lo observado en células U937, el incremento de $O_2^{\cdot-}$ conducía a una disminución progresiva y sostenida de los niveles de GSH. Es decir que la reducción de potencia no podía explicarse por incrementos de GSH, dado que la respuesta antioxidante no estaba actuando fuertemente contra las drogas y no podría ser un mecanismo compensador predominante. Debíamos pensar entonces en otras respuestas de estrés que promovieran la sobrevida, ya que aun cuando el nivel de $O_2^{\cdot-}$ se incrementó y el nivel de GSH se redujo, la potencia relativa de los fármacos combinados disminuyó. Por ejemplo, para el nivel de efecto 50%, la potencia relativa de TOA medida como DRI (que expresa la potencia en la combinatoria en comparación a la potencia como droga sola) fue de 1.27, indicando que la potencia de TOA para lograr un 50% de muerte celular cuando está combinado con MG132, es casi la mitad (61,8%) que cuando está presente como droga sola (100% correspondiente al valor de DRI =2.0).

4.3.2 TOA y MG132 no tienen efecto sobre el PMM en las células Raji

Por otra parte observamos un resultado llamativo. Existe una gran cantidad de trabajos publicados acerca de que el TOA induce ERO y disminución del PMM, y así lo habíamos comprobado también en nuestro estudio en la línea U937, cuando evaluamos el PMM con la dosis CE50 de TOA a 72hs, en células incubadas sólo 24hs. Si bien el 50% de las células U937 mueren a 72hs con la CE50, cuando se evalúa a 24hs la viabilidad es muy elevada, pero sin embargo ya se hace evidente el daño mitocondrial por la caída del PMM. Por el contrario, en células Raji, la CE50 de TOA a 72hs, evaluada a 24hs, no produjo cambio alguno en el PMM. Es decir que la muerte celular a 72hs en células Raji, se produce aun cuando las mitocondrias no muestran una evidencia clara de daño, en su evaluación a las 24hs. Este resultado es más llamativo, cuando se observa además que los niveles de GSH en las células Raji, tienen una caída importante a las 24hs, cuando se utiliza la CE50 72hs, y que los niveles de O_2^- aumentan en las mismas condiciones. Estas tres características del efecto del TOA en células Raji se mantienen al combinarse con MG132. Es decir, se mantiene un PMM similar al basal, a la vez que aumentan el O_2^- y caen los niveles de GSH.

4.4 Las causas del antagonismo TOA+MG132 en células Raji y su reversión farmacológica

4.4.1 ¿Es posible identificar el mecanismo que causa la caída de potencia relativa citotóxica en la combinación TOA+MG132 en células Raji?

Nos preguntamos entonces lo siguiente: dado que existe una caída en la potencia relativa de TOA al combinarse con MG132, lo cual se hace evidente como un claro antagonismo, en el que el CI se mantiene por encima de 1 en casi todo el rango de efecto, ¿qué respuestas de estrés celular podrían activarse para explicar esta merma de potencia?

Por otra parte habíamos logrado con éxito que una combinación en la que la potencia de las drogas aumenta (sinergismo), se comporte de manera exactamente opuesta (antagónica) reduciendo su potencia relativa, por medio de la supresión del mecanismo que encontramos como crítico para el resultado de la combinación (aumento en los niveles de GSH por incremento de O_2^- en U937)

Nos planteamos entonces si era posible identificar un mecanismo crítico, para la interacción antagónica y merma en la potencia de TOA y MG132 combinados. Y en tal caso, si la inhibición de dicho mecanismo podía lograr que la interacción fuera exactamente opuesta, aumentando la potencia de TOA y MG132.

4.4.2 La autofagia y la sobreexpresión de BNIP3 en la muerte celular inducida por TOA

El TOA tiene a las mitocondrias como uno de sus blancos, provocando un aumento de ERO intracelular y activando la apoptosis intrínseca (Emadi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008a). En varios modelos se ha demostrado que el TOA induce autofagia, y que la inhibición de esta última puede resultar en la supresión de los efectos citotóxicos del TOA sobre las células leucémicas (Goussetis *et al.*, 2010; Isakson *et al.*, 2010). Nuestro estudio mostró que la combinación TOA+MG132 aumentó la autofagia en las células U937 y Raji, luego de 24h de exposición, con dosis que resultan citotóxicas a las 72hs. Por otra parte, la expresión de BNIP3 en las células U937 fue constitutiva, aunque no así en células Raji.

Estudios previos de otros autores, han demostrado que el TOA puede inducir citotoxicidad en células de glioma maligno, a través de un mecanismo mediado por BNIP3, en el que se observa inducción de autofagia (Kanzawa *et al.*, 2005). Si bien estos estudios demostraron que la causa de la muerte celular es el incremento en la expresión de BNIP3 inducido por TOA, no han demostrado que la supresión de la autofagia causa la inhibición de la muerte celular. Es decir, se trata de muerte *con* autofagia y no *por* autofagia. Según otros estudios, la muerte celular inducida por la hipoxia, es también consecuencia de la expresión incrementada de BNIP3, y ocurre junto al incremento de autofagia en células de glioma y cáncer mama (Azad *et al.*, 2008). Por otra parte, un análisis de microarrays de cADN, demostró que TOA incrementa la expresión de varios genes implicados en la respuesta a la hipoxia (Kanzawa *et al.*, 2005). Algunos autores han sugerido que el TOA puede inducir un estado hipóxico en las células tumorales, en el cual la expresión de BNIP3 podría aumentar notablemente, llevando a la autofagia primero y la muerte celular después (Kanzawa *et al.*, 2005).

4.4.3 Autofagia y expresión de BNIP3 en células U937 y Raji; silenciamiento epigenético de BNIP3 como forma de resistencia citotóxica

Nuestros hallazgos en células U937 coinciden con las observaciones que demuestran que la expresión de BNIP3 se encuentra aumentada en varios tipos de cáncer, y que este hecho se asocia a mal pronóstico (Giatromanolaki *et al.*, 2008; Leo *et al.*, 2006; Sowter *et al.*, 2003). Por el contrario, encontramos que las células Raji tienen una expresión muy baja de BNIP3 a nivel de ARNm y proteína. La expresión baja o ausente de BNIP3 puede resultar en la incapacidad de las células tumorales para iniciar la muerte celular, a la vez que esta característica se asocia con un fenotipo quimiorresistente, con menor supervivencia de los pacientes (Erkan *et al.*, 2005; Murai *et al.*, 2005b;

[Okami et al., 2004](#)). En estudios de muestras de pacientes con mieloma múltiple, se ha podido demostrar que las regiones del promotor de BNIP3 se encuentran metiladas. Esta metilación se correlacionó de manera significativa con baja supervivencia de los pacientes ([Heller et al., 2008](#)). Se ha propuesto que las células cancerosas seleccionan el silenciamiento de la expresión de BNIP3, para evitar señales de muerte inducidas por hipoxia o por medicamentos quimioterapéuticos. ([Burton et al., 2009](#); [Ishida et al., 2007](#); [Okami et al., 2004](#)). Nuestros resultados demostraron que el inhibidor de HDAC VPA, incrementó la expresión de BNIP3 en células Raji

4.4.4 ¿Es posible incrementar la expresión de BNIP3 por drogas epigenéticas en células Raji? Y en tal caso ¿es eso suficiente para revertir el antagonismo entre TOA y MG132?

Habiendo encontrado que la combinación TOA+MG132 aumentó la autofagia en ambas líneas celulares, y que BNIP3 se encontraba expresado en células U937, asumimos que la resistencia de las células Raji a la combinación TOA+MG132, podría residir en el silenciamiento epigenético de BNIP3. Siguiendo esta línea de pensamiento, imaginamos que la adición de una dosis de VPA suficientemente alta como para incrementar la expresión de BNIP3, pero suficientemente baja como para no tener efecto citotóxico alguno, permitiría que se promueva el rol pro-muerte celular de BNIP3 frente a la exposición a TOA+MG132. De esta manera, la potencia citotóxica relativa de TOA y MG132 se incrementaría, y la interacción farmacológica pasaría así a ser sinérgica. Sin embargo el fuerte antagonismo que observamos entre TOA y MG132, en presencia de bajas dosis de VPA, nos llevó a considerar que el incremento de expresión de BNIP3 en células Raji, estaba ejerciendo un papel protector contra los efectos del TOA. Es decir, la presencia de VPA estaba promoviendo una respuesta protectora para la supervivencia celular, más allá de estar aumentando la expresión de BNIP3 por desilenciamiento epigenético.

4.4.5 ¿Es la autofagia un mecanismo celular que promueve la supervivencia frente el efecto citotóxico de TOA y MG132?

Observamos que un estudio de otros autores realizado en la línea celular de miocardiocitos HL-1, había demostrado que la autofagia protegía de la muerte celular mediada por BNIP3 ([Hamacher-Brady et al., 2007](#)), en tanto que otros autores también demostraron que la autofagia inducida por BNIP3 durante la hipoxia, conforma un mecanismo de supervivencia, que se opone a la muerte celular inducida por la hipoxia ([Bellot et al., 2009](#)). La función de muerte de BNIP3 en un ambiente de hipoxia tumoral fue cuestionada en otros estudios, ya que sus autores encontraron que una

inducción rápida y completa de BNIP3, podía en cambio proteger contra la muerte celular a través de un proceso de autofagia (Pouyssegur *et al.*, 2006). Por otra parte, algunos autores propusieron que BNIP3 es una proteína pro-autofágica con un papel estrictamente pro-supervivencia, que sería indispensable para la inducción óptima de la autofagia en hipoxia (Mazure *et al.*, 2009).

En nuestro estudio, BNIP3 mostró una distribución restringida a las zonas nucleares y perinucleares en células Raji tratadas con VPA. Esta observación era claramente contrapuesta a la distribución de BNIP3 y de las mitocondrias en células U937. Un estudio previo de otros autores, demostró que la localización nuclear de BNIP3 coincide con la ausencia de su función pro-muerte celular (Burton *et al.*, 2006). En nuestro estudio, observamos que las dosis de TOA+MG132 que a 72hs resultan citotóxicas, no tienen ningún efecto sobre el PMM de las células Raji a las 24hs. Esto contrasta fuertemente con lo observado en células U937, donde las dosis que son citotóxicas a 72hs, causan previamente una caída del PMM a las 24hs, aunque sin afectar la viabilidad celular durante las primeras 24hs del tratamiento.

Por otra parte, el tratamiento con VPA como única droga aumenta la expresión de BNIP3 en células Raji, mientras que MG132 sólo incrementa el ARNm de BNIP3 con la presencia simultánea de VPA. A pesar de este incremento en BNIP3, el tratamiento con VPA no causó modificación alguna en el estado basal del PMM de las células Raji, observándose incluso un leve aumento con respecto al nivel basal, especialmente cuando VPA se combinó con MG132. Sin embargo, una gran mayoría de estudios coinciden en que BNIP3 se localiza principalmente en las mitocondrias, e induce pérdida del PMM y muerte celular (Kubli *et al.*, 2007; Regula *et al.*, 2002; Vande Velde *et al.*, 2000). Esta visión es consistente con nuestros resultados en la línea U937, que es positiva para BNIP3 de manera constitutiva, pero no así con los resultados obtenidos en las células Raji, en las que BNIP3 se expresó mediante el tratamiento con VPA.

4.4.6 La mitofagia es una respuesta que promueve la supervivencia de las células Raji y causa una reducción en la potencia relativa de TOA y MG132 combinadas

Una serie de estudios recientes han demostrado que las mitocondrias con morfología fragmentada que poseen un bajo PMM, se agregan en la región perinuclear donde son removidas por un proceso de autofagia selectiva (Lee *et al.*, 2010; Twig *et al.*, 2008; Vives-Bauza *et al.*, 2010). La eliminación selectiva de las mitocondrias por autofagia, a la que a menudo se la denomina mitofagia, puede

ocurrir independientemente de la autofagia general. Esto permite que las mitocondrias dañadas o que se encuentran en número excesivo para las demandas metabólicas de las células, puedan ser eliminadas de manera específica, incluso en condiciones de gran disponibilidad de nutrientes, siendo esta última una situación en la que es sabido que la autofagia general se encuentra inhibida (Ding *et al.*, 2012).

El transporte de las mitocondrias a la región perinuclear para su eliminación es dependiente de la red de microtúbulos, y por esta razón el tratamiento de células con agentes desestabilizadores de microtúbulos, inhibe la agregación mitocondrial perinuclear y la mitofagia (Lee *et al.*, 2010; Vives-Bauza *et al.*, 2010). Algunos autores sugieren que el transporte de las mitocondrias a través de la red de microtúbulos a la región perinuclear, constituye un paso esencial en la vía de degradación mitocondrial (Gottlieb *et al.*, 2011). La VCR, al igual que otros alcaloides de la vinca y aún otros inhibidores de microtúbulos, también bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, para así detener el flujo autofágico en su fase final (Amenta *et al.*, 1977; Mackeh *et al.*, 2013; Munafò *et al.*, 2001).

El tratamiento con VCR cambió además la distribución celular de la proteína BNIP3 inducida por VPA, en tanto que las mitocondrias también mostraron una redistribución muy similar. Además, en las muestras tratadas con VCR, los autofagosomas mostraron colocalización con las mitocondrias, mientras que la masa mitocondrial se incrementó, a la vez que el porcentaje de células con el PMM colapsado aumentó con respecto al valor basal. Por lo tanto, concluimos que la VCR causó un bloqueo del flujo mitofágico, y como consecuencia de ello se produjo una acumulación de mitocondrias dañadas (Hanna *et al.*, 2012; Klionsky *et al.*, 2016a). En este punto, nuestros resultados comienzan a encontrar una reconciliación parcial con el paradigma que sostiene que BNIP3 induce pérdida del PMM y la muerte celular (Kubli *et al.*, 2007; Regula *et al.*, 2002; Vande Velde *et al.*, 2000).

4.4.7 El bloqueo de la mitofagia junto a la expresión de BNIP3 en células Raji, causa un aumento en la potencia relativa de TOA y MG132, suficiente como para pasar de un antagonismo a un sinergismo

La completa reconciliación con este paradigma se hizo evidente luego de confirmar que el tipo de interacción entre TOA y MG132, pasó de un antagonismo ($CI > 1$) a un sinergismo ($CI < 1$) en presencia de una dosis baja de VPA, capaz de incrementar BNIP3, y de una dosis baja de VCR que fuera capaz de bloquear el flujo mitofágico. Debe destacarse que de manera notable, el

antagonismo entre TOA y MG132 no se modificó cuando se agregó únicamente una dosis baja de VCR, indicando que la expresión aumentada de BNIP3 aportada por VPA, sería una condición crítica para lograr el aumento de la potencia relativa citotóxica de TOA y MG132 en las células Raji.

La contribución de la expresión de BNIP3 a la potencia citotóxica de TOA y MG132, podría residir en su ubicación sostenida en las mitocondrias como resultado del bloqueo del flujo mitofágico. Esto podría contribuir al predominio del efecto pro-muerte celular de BNIP3. Esta interpretación admite los dos roles de BNIP3 que son motivo de controversia, es decir su rol pro-muerte celular y su rol en favor de la sobrevivencia. Por un lado, BNIP3 formaría parte de la respuesta mitofágica, teniendo un rol en favor de la sobrevivencia celular, contribuyendo a eliminar las mitocondrias dañadas y evitar el efecto nocivo de TOA y MG132. Este efecto de BNIP3 y de la mitofagia, lograría que las drogas combinadas no alcancen el umbral necesario para iniciar la apoptosis intrínseca.

Por otro lado, al bloquear el flujo mitofágico se estaría anulando esta respuesta de estrés protectora. En este contexto, la expresión de BNIP3 ya no tendría utilidad para la sobrevivencia celular. Sin embargo, en esta nueva situación BNIP3 podría contribuir a asegurar la muerte celular como una respuesta homeostática, toda vez que la mitofagia, autofagia y otros mecanismos defensivos que dependen de los microtúbulos y aun los proteasomas, han sido vulnerados. La inducción de muerte celular junto a una variedad de respuestas de estrés no sería novedosa, ya que ha sido descrita por ejemplo en la respuesta de estrés de retículo endoplásmico (RE), donde la expresión de IRE1 y ATF6 potencian la respuesta de tolerancia a los defectos de plegado proteico, mientras que PERC incrementa la expresión de la proteína pro apoptótica CHOP (Walter *et al.*, 2011). Si el incremento de IRE1 y ATF6 no son suficientes para contener el daño que conllevan los defectos de plegado proteico, predomina el rol proapoptótico de CHOP (Labbadia *et al.*, 2015). Una situación similar ocurre con la exposición de la cardiolipina mitocondrial, por fuera de su localización normal en la membrana interna mitocondrial (Chu *et al.*, 2013). En un principio tiene un efecto inductor de la mitofagia y contribuye a la sobrevivencia celular, pero cuando se bloquea la mitofagia o se induce un daño mitocondrial excesivo, la cardiolipina contribuye a la liberación de citocromo c y al inicio de la apoptosis intrínseca (Li *et al.*, 2015; Raemy *et al.*, 2014).

La persistencia de esta situación en la que no es posible la ejecución de la mitofagia como una respuesta protectora, daría lugar a una carga creciente de mitocondrias dañadas. Sin embargo los resultados son también concordantes con la idea de que BNIP3 es parte de un mecanismo de

resistencia que favorece supervivencia celular, al eliminar las mitocondrias dañadas a través de la mitofagia (Quinsay *et al.*, 2010; Rikka *et al.*, 2011) y contribuye a reducir el riesgo potencial que conlleva esta situación. Por lo tanto, para cambiar el tipo de interacción citotóxica de TOA y MG132 en las células Raji, pasando de un antagonismo a un sinergismo, se necesita superar un sistema de resistencia en el que participan BNIP3, la red de microtúbulos y la autofagia selectiva de las mitocondrias (mitofagia).

4.5 ¿Es posible evaluar la interacción TOA y MG132 en cuanto al efecto citotóxico en células de pacientes? Y en tal caso cual es el efecto de VPA y VCR?

Nuestra principal conclusión es que revertir el silenciamiento epigenético de BNIP3, puede resultar que la mitofagia se vea mejorada, y de esta manera se le confiera a las células una mayor tolerancia al daño mitocondrial. Esto puede tener consecuencias nefastas para la eficacia de drogas que apuntan a ejercer efecto citotóxico por vía del daño mitocondrial, el incremento de ERO y la reducción del PMM, como es el caso de TOA. En una situación de este tipo, los fármacos epigenéticos aumentarían la supervivencia de las células tumorales. Esto es importante, ya que fármacos como los hipometilantes y los inhibidores de histona deacetilasa son frecuentemente propuestos para el tratamiento de leucemias, en combinaciones con drogas que provocan inducción de apoptosis intrínseca como es el caso de la fludarabina. La conclusión es que en estos casos es necesario asegurar el bloqueo de la mitofagia, por ejemplo utilizando fármacos inhibidores de la red de microtúbulos.

El sistema de resistencia que describimos en este estudio, no está restringido a las células de linfoma de Burkitt, sino que puede estar presente en varios tipos de células neoplásicas. Por otra parte, es posible que pueda estar presente en algunos pacientes y ausente en otros con una misma enfermedad, pudiendo explicar así diferencias en la respuesta al tratamiento. En la Fig. 3.57 mostramos los resultados de un análisis de la combinación TOA+MG132, idéntico al que realizamos en las células Raji, que fue llevado a cabo en las células patológicas obtenidas de sangre periférica de un paciente diagnosticado con linfoma de células T del adulto, asociado a infección por HTLV-1. El paciente se encontraba en tratamiento de apoyo con cuidados paliativos, luego de una falta de respuesta al tratamiento con a Peg-interferón alfa-2 β . El análisis mostró que TOA y MG132 fueron antagónicos, pero la interacción pudo ser modificada por completo y transformarse en sinergismo, mediante el agregado de dosis bajas de VPA y VCR. En las células de este paciente en particular, la

CE50 de TOA y MG132 se redujo más de 10 veces en presencia de VPA + VCR (Fig. 3.57). En un segundo caso que se muestra en la Fig. 3.56, evaluamos el efecto individual y combinado de TOA y VPA en células leucémicas, obtenidas de la circulación periférica de un paciente diagnosticado con leucemia mieloide aguda, correspondiente a la clasificación FAB M6 (eritroleucemia). Los fármacos combinados fueron sinérgicos como fue el caso de la línea celular U937 (leucemia promonocítica, resultado presentado en la Fig. 3.7A). El agregado de VCR 1 μ M no incrementó la muerte celular por encima de los valores basales, pero sin embargo incrementó el sinergismo de la combinación TOA + VPA (Fig. 3.56).

Nuestros hallazgos pueden tener contribuciones potenciales para las terapias combinadas que incluyen inhibidores de histona desacetilasa e hipometilantes. En la actualidad, no se conocen las causas ni los mecanismos de resistencia y falta de respuesta terapéutica a los hipometilantes, ya sea en su uso como monodrogas o combinados con HDAC. Por otra parte es difícil diseñar combinaciones específicas que puedan tener éxito en pacientes resistentes al tratamiento con hipometilantes y HDACs. Además, uno de los problemas más importantes es que actualmente no se cuenta con predictores de respuesta a los fármacos hipometilantes (García-Manero, 2011). Nuestro estudio introduce el concepto de que un incremento en la mitofagia o flujo mitofágico, es una posible explicación a la falta de respuesta a las terapias basadas en hipometilantes y HDACs.

4.6 Acerca de la regulación recíproca entre el sistema ubiquitina proteasoma y la mitofagia

MG132 es un aldehído peptídico, que inhibe principalmente la actividad quimiotripsina-símil de la subunidad 26S del proteasoma, al unirse covalentemente al sitio activo de la subunidad β 5 (Han *et al.*, 2009; Kloss *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 1998). MG132 tiene el mismo blanco que Bortezomib y otros inhibidores de proteasoma de nueva generación. Las mutaciones en el bolsillo de unión a Bortezomib, en la subunidad β 5 altamente conservado, producen resistencia cruzada con MG132 (Oerlemans *et al.*, 2008). Otra de las causas de resistencia a Bortezomib, MG132 y las nuevas generaciones de inhibidores del proteasoma, es la presencia de métodos alternativos de degradación de las proteínas como la autofagia (Kumar *et al.*, 2008). El sistema de ubiquitina-proteasoma y autofagia pueden acoplarse funcionalmente, ya que la inhibición del proteasoma activa la autofagia, mientras que la supresión de la autofagia, promueve la acumulación de agregados de proteínas polyubiquitiniladas (Ding *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, la potencia relativa de MG132 en células Raji se redujo en la combinación TOA+MG132, en tanto que esa reducción fue mayor cuando agregamos VPA en concentración subletal. Sin embargo al agregar VCR la potencia relativa de MG132 en la combinación con TOA, se incrementó por encima de su potencia como droga sola. Es decir que el bloqueo de la autofagia y la mitofagia por medio de la inhibición de la red de microtúbulos tuvo como consecuencia, un incremento en la potencia citotóxica del inhibidor del proteasoma. Nuestros resultados sugieren entonces que el mayor flujo mitofágico, puede explicar la resistencia a inhibidores del proteasoma (Jia *et al.*, 2012). La compensación recíproca entre la actividad del proteasoma y la mitofagia podría tener mayor o menor importancia dependiendo de cada neoplasia en particular y su grado de progresión y agresividad.

4.7 La interacción TOA+MG132 como biomarcador de efecto y la influencia de mecanismos de resistencia

Nuestro estudio presenta varios biomarcadores de efecto potenciales que podrían convertirse en predictores de respuesta. Estos biomarcadores incluyen el tipo de interacción entre TOA y un inhibidor del proteasoma con respecto al efecto citotóxico, cambios en la expresión de BNIP3 inducida por fármacos epigenéticos, flujo mitofágico basal y cambios en el flujo mitofágico inducidos por drogas tales como VCR y VPA, junto con su impacto en la producción de ERO intracelular y PMM. Todos estos biomarcadores pueden ser evaluados en modelos animales de xenoinjerto y en células neoplásicas obtenidas de muestras de pacientes.

5 Conclusiones Parciales

Sección I

Efecto citotóxico de TOA y las combinatorias sobre las líneas U937 y Raji

Los resultados expuestos en esta sección, han permitido determinar la potencia citotóxica de los compuestos TOA, MG132, CAPE y las combinaciones TOA+MG132 y TOA+CAPE sobre las líneas celulares U937 (leucemia promonocítica) y Raji (Linfoma de Burkitt), ambas consideradas resistentes al TOA. Determinamos la capacidad de los tratamientos individuales y combinados de inhibir la proliferación de las líneas celulares, y evaluamos el tipo de interacción existente entre las drogas que formaban parte de los tratamientos combinados. Esto se llevó a cabo mediante un modelo probabilístico (regresión logística) en todo el rango de efecto estudiado, calculando el índice de combinación de Chou-Talalay, permitiendo así evaluar la potencia relativa de los fármacos cuando son usados en forma combinada con respecto su uso individual.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. La combinatoria TOA+MG132 mostró sinergismo en cuanto al efecto citotóxico en la línea U937 en todo el rango de efecto, mientras que en el caso de la línea Raji esta misma combinación se comportó de manera antagónica. En cambio, el tratamiento combinado TOA+CAPE se comportó de manera antagónica sobre ambas líneas celulares.
2. Ambos tratamientos combinados se comportaron de manera antagónica sobre las dos líneas en cuanto a su capacidad de inhibir la proliferación celular.
3. Lo observado para la combinación TOA+MG132 en la línea U937 demuestra que pueden coexistir dos tipos de interacción opuestos (sinergismo y antagonismo), para la misma combinación de fármacos, pero considerando medidas de efecto diferentes (inhibición de la proliferación y muerte celular).
4. El CI fue variable a lo largo del rango de efectos, observándose incremento del antagonismo y del sinergismo con niveles de efecto progresivamente mayores. Esto ocurrió como consecuencia de las diferencias de susceptibilidad individual de las células en estudio a las drogas citotóxicas, y se reflejó a través de perfiles de CDR con distintas pendientes.

5. La CE50 es la mínima dosis que produce muerte regulada en el 50% de las células en estudio. El rango de concentraciones por debajo de la CE50 (por ejemplo CE25-CE50) es donde las respuestas de estrés que se oponen a la muerte regulada se encuentran en su máxima expresión.

Sección II

Modificación en la producción de anión superóxido inducida por TOA, MG132 y CAPE en el rango de dosis con efecto citotóxico

En esta sección se evaluó en las líneas celulares U937 y Raji, la capacidad de los tratamientos individuales y combinados de generar cambios en los niveles de anión superóxido y glutatión reducido intracelulares, para luego correlacionar estas observaciones con el tipo de interacción determinado en la sección I. Los resultados obtenidos indican que:

1. TOA fue capaz de generar altos niveles de $O_2^{\cdot -}$ en ambas líneas celulares lo que se acompañó de una disminución de los niveles de GSH en ambas líneas. Sin embargo, en la línea U937 se observó un aumento por sobre los niveles basales. En cambio, en las células Raji los niveles de GSH se mantuvieron bajos.
2. MG132 no fue capaz de generar cambios apreciables en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ ni GSH en ninguna de las condiciones ensayadas.
3. CAPE generó altos niveles de $O_2^{\cdot -}$ en ambas líneas alcanzando niveles mayores a lo observado para TOA. Esto fue acompañado de un aumento de GSH en la línea U937 y una marcada disminución en la línea Raji.
4. La combinatoria TOA+MG132 no generó un incremento significativo de $O_2^{\cdot -}$ en la línea U937, en tanto que los niveles de GSH se redujeron durante las primeras 6hs de exposición y luego aumentaron en el transcurso de 24hs. En cambio, en la línea Raji la combinación TOA+MG132 aumentó $O_2^{\cdot -}$ y disminuyó los niveles de GSH.
5. La combinatoria TOA+CAPE generó en todos los casos un gran aumento de $O_2^{\cdot -}$ acompañado de una disminución de GSH en la línea Raji y un marcado aumento en la línea U937.
6. El agregado de una dosis subcitotóxica de H_2O_2 a la combinación TOA+MG132 en células U937, aumentó $O_2^{\cdot -}$ y aumento significativamente el nivel de GSH. En esa condición la interacción sinérgica de TOA y MG132 en U937 pasó a ser antagónica.

Concluimos entonces que el sinergismo TOA+MG132 en células U937 se asocia a la generación de bajos niveles de O_2^- y a la ausencia de una respuesta celular de aumento de GSH. La potencia relativa de TOA y MG132 se reduce en la combinación debido al incremento de GSH. Por el contrario, el antagonismo TOA+CAPE en U937 se asocia a un aumento en la generación de O_2^- acompañado de un fuerte incremento en los niveles de GSH. Por el contrario, en la línea Raji ambas combinatorias resultan antagónicas a pesar de que los cambios generados sobre los niveles de O_2^- y GSH se asemejan a los observados en la línea U937. Esto demuestra que la caída de la potencia relativa de TOA y MG132 en las células Raji, no puede explicarse por incremento de GSH como en el caso de la línea U937 en presencia de concentraciones subcitotóxicas de H_2O_2 .

Sección III

Expresión de BNIP3 y su relación con el efecto citotóxico inducido por TOA+MG132

La serie de ensayos realizados a lo largo de esta sección ha permitido evaluar la expresión del gen y la proteína BNIP3 en las líneas U937 y Raji y su modulación por parte de los tratamientos en estudio. Además, se determinó el efecto a nivel epigenético de VPA y 5-AZA sobre la línea Raji y los cambios en la potencia relativa de TOA+MG132 en presencia de dichos compuestos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. La línea U937 expresa de manera basal BNIP3 a nivel ARNm y proteína distribuyéndose esta última de manera homogénea por todo el citoplasma. MG132 genera en esta línea un incremento de la expresión del ARNm.
2. En la línea Raji la expresión basal de BNIP3 es prácticamente nula a nivel de mensajero, detectándose niveles sumamente bajos de la proteína.
3. El tratamiento de la línea Raji con concentraciones sub letales de 5-AZA o VPA aumenta sensiblemente la expresión tanto del mensajero como de la proteína BNIP3 ubicándose esta última en zonas cercanas al núcleo y alejadas de la periferia celular.
4. El tratamiento con VPA 3mM en U937 aumenta los niveles de mensajero con respecto al basal. El MG132 genera en la línea Raji un aumento dosis dependiente del mensajero de BNIP3 al co-tratar estas células con VPA 3mM.

5. La combinatoria TOA+VPA se comporta de manera sinérgica en U937 pero presenta un gran antagonismo en la línea Raji.
6. La combinatoria TOA+MG132 en presencia de VPA en concentraciones subletales muestra un comportamiento antagónico en la línea Raji. Este antagonismo es aún mayor que el observado para dicha combinatoria en ausencia de VPA.

En resumen, se demostró que en la línea Raji se encuentra silenciado el gen de BNIP3 y que la expresión del mismo puede ser restablecida mediante el uso de fármacos epigenéticos como VPA y 5-AZA. Además, se determinó que a pesar de lograr la expresión de BNIP3 en Raji, la combinatoria TOA+MG132 continúa comportándose de manera antagónica, por lo que el silenciamiento de BNIP3 no es el único mecanismo de respuesta que estas células ponen en juego frente a los tratamientos ensayados.

Sección IV

Inducción de autofagia por TOA y MG132 en las células Raji y U937

Dado el rol como mecanismo de resistencia a drogas citotóxicas que se le asigna al proceso autofágico desde hace ya algunos años, en esta sección de resultados se evaluó la ocurrencia de autofagia en las líneas celulares U937 y Raji. Se estudió además la influencia de la autofagia sobre la potencia relativa de los tratamientos. Para esto, se desarrolló un ensayo de determinación simultánea de contenido de autofagosomas y muerte celular por citometría de flujo. Luego de esta serie de ensayos podemos concluir que:

1. Si bien ambas líneas realizan autofagia de manera basal, la presencia de autofagosomas no es homogénea entre células de una misma muestra. Además, los autofagosomas de la línea Raji se encuentran principalmente en zonas cercanas al núcleo mientras que los de U937 se distribuyen por toda el área celular.
2. La citometría de flujo con MDC permite determinar de manera efectiva y específica, cambios en los niveles de autofagia inducidos por los tratamientos en estudio y por conocidos inductores e inhibidores de este proceso.
3. TOA, TOA+MG132 y VPA son capaces de inducir altos niveles de autofagia en la línea Raji y este efecto es mucho más notorio a bajos niveles de efecto. Además, medida que aumenta el efecto

citotóxico disminuye el número de células que son capaces de responder con un aumento de autofagia.

4. La VCR en dosis sub letales, es capaz de inhibir el flujo autofágico a corto y largo plazo. Luego del tratamiento con VCR hay una redistribución de autofagosomas hacia zonas periféricas de la célula.
5. A pesar de la inhibición de autofagia por parte de la VCR, la combinatoria TOA+MG132 sigue comportándose de manera antagónica en la línea Raji.
6. Se logró una interacción de tipo sinérgica para la combinatoria TOA+MG132 en la línea Raji al co-tratar con VPA 3mM+ VCR 1 μ M. Esto significa que es necesaria la expresión de BNIP3 en simultaneo con la inhibición de autofagia para aumentar la potencia relativa de TOA+MG132 en la línea Raji.

Sección V

Eliminación de mitocondrias como forma de resistencia al TOA combinado con MG132

La autofagia como mecanismo de eliminación de componentes celulares dañados, puede asociarse a una reducción del efecto citotóxico como ha sido probado en varios modelos. Anteriormente hemos demostrado que la inhibición del flujo autofágico por sí solo, no es suficiente para sensibilizar a la línea Raji a la acción citotóxica de TOA+MG132, pero sí es necesaria cuando además se encuentra expresada la proteína BNIP3. Teniendo en cuenta que esta proteína es de localización mitocondrial y que la mitocondria es uno de los principales blancos del TOA, en esta sección de resultados, se estudió el proceso mitofágico como posible mecanismo de resistencia de la línea Raji. Los resultados de esta sección nos permiten concluir que:

1. TOA y TOA+MG132 generan pérdida de PMM en la línea U937, pero no en la línea Raji. La ausencia de células con PMM colapsado es llamativa teniendo en cuenta que en células Raji, estos tratamientos generan altos niveles de O₂⁻ y una caída en los niveles de GSH.
2. En la línea Raji, luego de los tratamientos con TOA+MG132 y VPA 3mM, las mitocondrias se concentran en áreas cercanas al núcleo, en una distribución compatible con el denominado CPNM, lo que se acompaña de una disminución del AMR. Por el contrario, en la línea U937, TOA+MG132 genera un aumento del AMR y las mitocondrias se distribuyen de manera

homogénea por el citoplasma, mientras que VPA 3mM no genera cambios significativos del AMR.

3. El tratamiento con TOA o TOA+MG132 genera una reducción significativa de la MM en células Raji, mientras que en la línea U937 estos tratamientos provocan un aumento de la MM.
4. El tratamiento en concentraciones sub-citotóxicas con VPA+VCR genera un aumento significativo del AMR y de la MM en ambas líneas celulares. Además, este tratamiento provoca la desorganización del CPNM que se observaba en la línea Raji con VPA solo.
5. El tratamiento de las células Raji con TOA, y TOA+MG132 en presencia de VPA+VCR, genera un aumento significativo de la MM oponiéndose a la disminución observada en ausencia de VPA+VCR. Esto se acompaña de la aparición de un porcentaje significativo de células con PMM colapsado. Estas observaciones se relacionan con el sinergismo TOA+MG132 observado en células Raji en presencia de VPA+VCR.
6. En la línea Raji, el tratamiento con VPA 3mM genera un aumento en la colocalización entre mitocondrias y autofagosomas, que se hace mucho más evidente en presencia de VPA+VCR. Esto no ocurre en la línea U937.
7. Se demostró en la línea Raji que luego del aumento de la expresión de BNIP3 con VPA en concentraciones sub-citotóxicas, existe una alta colocalización entre esta proteína y las mitocondrias.

En resumen, concluimos entonces que VPA induce un aumento del flujo mitofágico en células Raji, permitiendo la eliminación de mitocondrias dañadas. Esto explica la caída de la potencia citotóxica que se observa al agregar VPA a la combinación TOA+MG132. El agregado de VCR bloquea el flujo mitofágico provocando un aumento de la masa mitocondrial, con desorganización del CPNM y una acumulación de mitocondrias dañadas por TOA con bajo PMM. El bloqueo del flujo mitofágico y la acumulación de mitocondrias dañadas explica el incremento de potencia de la combinación TOA+MG132, en presencia de dosis subletales de VPA y VCR. BNIP3 podría actuar en la mitocondria como un receptor de mitofagia o como un inductor de muerte, dependiendo de la intensidad del flujo mitofágico. El bloqueo del flujo mitofágico forzaría el predominio de su rol inductor de muerte.

Sección VI

Evaluación de la interacción de fármacos citotóxicos en células de pacientes con neoplasias hematológicas

El TOA es un fármaco utilizado clínicamente en leucemia promielocítica, pero otros tipos de leucemias y linfomas presentan resistencia a su efecto citotóxico. De manera similar, para los inhibidores del proteasoma se observa sensibilidad en mieloma múltiple, pero resistencia en otras neoplasias en las que se los ha ensayado como monodroga. Surge entonces el interés por evaluar la sensibilidad a los fármacos que hemos estudiado en las líneas celulares U937 y Raji en forma individual y combinada, en células neoplásicas obtenidas de pacientes con patologías relacionadas. Los resultados obtenidos a partir de tres casos clínicos estudiados, nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. En un caso de leucemia M6 observamos un situación similar a la observada en células U937, con un sinergismo entre TOA y VPA que se incrementó notoriamente con el agregado de VCR subletal.
2. En un caso de leucemia T del adulto muy avanzada y ya en tratamiento paliativo, observamos un pronunciado antagonismo entre TOA y MG132, con reversión completa a muy alto sinergismo con el agregado de concentraciones subletales de VPA y VCR. En esta situación, los resultados obtenidos se asemejan a lo que se observa en la línea Raji.
3. En un caso de LLC observamos también antagonismo entre TOA y MG132, que se revirtió a sinergismo con el agregado de VPA y VCR

Concluimos entonces que los mecanismos de resistencia a la combinatoria TOA+MG132, estudiados en el transcurso de este trabajo, podrían estar presentes en distintas formas de leucemias y linfomas, particularmente en los casos más avanzados. El método de estudio aplicado permite evaluar en células de pacientes individuales, los efectos de las combinaciones en cuanto a su potencia citotóxica, y de esta manera puede ayudar a definir la relevancia de los mecanismos de resistencia que se detecten, o que hayan sido postulados para cada patología. Estos resultados pueden ser diferentes según el tipo y grado de progreso de la enfermedad.

6 Conclusiones Finales

Hemos utilizado el estudio de interacciones entre TOA y MG132, en lo que respecta a su efecto citotóxico sobre células de neoplasias hematológicas individualmente analizadas, como una herramienta de ayuda para la exploración de mecanismos de resistencia y sensibilidad a compuestos citotóxicos. A diferencia de los estudios que proponen evaluaciones de fenotipo de muerte (apoptosis, necroptosis, otras formas de muerte programada o regulada) en concentraciones predeterminadas, nuestro enfoque se centró en la evaluación del rango completo de efecto citotóxico. En particular nos focalizamos en el rango donde los aumentos progresivos de concentración de fármaco, producen aumentos progresivos de efecto citotóxico. Utilizamos funciones probabilísticas dosis-efecto citotóxico para obtener valores como la CE50, para la que demostramos que se trata de la mínima dosis capaz de iniciar un efecto de muerte celular activa en la mitad de las células de una población determinada. Esta medida tiene una crucial importancia para el estudio de la muerte regulada, es decir la muerte activa que ocurre como consecuencia de la presencia de una noxa, y que supera el esfuerzo de supervivencia de las respuestas celulares de estrés. Es decir, en la CE50 siempre hay muerte regulada y nunca se trata de una muerte pasiva. Esto permite caracterizar el fenotipo de muerte en el rango de concentraciones superior al CE50 (por ejemplo CE50-CE90) y explorar las respuestas de estrés que promueven la supervivencia celular en el rango inferior al CE50 (por ejemplo CE25-CE50).

Hemos extendido el uso de esta herramienta para el estudio de la interacción de TOA y MG132, evaluando los cambios de potencia relativa citotóxica de cada droga cuando se encuentran combinadas. Ya sea por medio del CI o la DRI de cada droga, hemos explorado el comportamiento en todo el rango de efectos. La conclusión general es que la potencia relativa citotóxica rara vez es constante en todo el rango de efectos, y que puede sufrir profundos cambios por encima y por debajo de la CE50, reflejando también los cambios en el balance entre las respuestas inductoras de muerte celular y promotoras de la supervivencia.

En el caso de las células U937, encontramos que la interacción sinérgica entre TOA y MG132, pudo transformarse en antagonismo aumentando el nivel de O_2^- mediante un tratamiento subletal con H_2O_2 . De esa manera logramos observar un perfil de antagonismo similar al que detectamos en células U937 con TOA+CAPE, en el que un alto nivel de O_2^- se asoció con aumento de GSH y menor potencia citotóxica. Sin embargo en células Raji la interacción TOA+MG132 fue antagónica, con

niveles bajos de GSH, y de esa manera quedó descartado el aumento de GSH como mecanismo que pudiera explicar la merma en la potencia citotóxica de los fármacos combinados.

Nos propusimos evaluar entonces el rol de otro mecanismo propuesto para explicar la resistencia a la citotoxicidad por TOA. Según antecedentes bibliográficos, el silenciamiento de BNIP3 podría actuar como un factor limitante del efecto citotóxico del TOA, y favorecer la sobrevida de las neoplasias en microambientes hostiles como la hipoxia. Confirmamos que las células Raji tenían una expresión casi nula de BNIP3, en tanto las células U937 mostraron una elevada expresión constitutiva. Encontramos que los fármacos epigenéticos VPA y azacitidina, restauraron la expresión de BNIP3 en células Raji. Sin embargo la potencia relativa de TOA y MG132 combinados, fue aún menor con la adición de VPA subletal. Esto sugería que el desilenciamiento epigenético, en lugar de favorecer el efecto citotóxico de las drogas combinadas, lo estaba en realidad limitando. Realizamos entonces una evaluación de flujo autofágico tanto en la línea U937 como Raji. En ambos casos encontramos un incremento como consecuencia de la exposición a los fármacos en estudio, que alcanzó su máximo en el rango CE25-CE50 y decreció abruptamente en el rango superior a la CE50. Más aún, el mismo perfil se observó con la evaluación realizada para VPA en células Raji, donde la inducción de autofagia ocurrió aún en rangos subletales. En base a estas observaciones asumimos que la autofagia podría actuar como mecanismo de resistencia. Para confirmarlo se realizó un bloqueo del flujo autofágico con el inhibidor de microtúbulos VCR. En estas condiciones la combinación de TOA+MG132 en presencia de VPA y VCR subletales, pasó de ser antagónica a ser sinérgica, demostrando que la autofagia era la respuesta promotora de supervivencia celular, que explicaba la caída de la potencia relativa de TOA y MG132 combinadas en las células Raji. De manera notable, el sinergismo entre TOA y MG132 no pudo alcanzarse con sólo el agregado de VCR subletal, demostrando que la expresión de BNIP3 tendría una contribución importante para incrementar la potencia citotóxica. Es decir que en estas condiciones observamos un predominio del rol promotor de muerte celular de BNIP3, tal como otros autores habían propuesto.

Por otra parte habíamos observado un resultado llamativo. El tratamiento de células Raji tanto con TOA como única droga como con la combinación TOA+MG132, mostró que aun cuando se incrementaron los niveles de O_2^- , y los niveles de GSH decrecieron significativamente, no encontrábamos modificación en la proporción de células con PMM colapsado, en tanto que las mitocondrias mostraban una localización predominantemente perinuclear (CPNM). Esto cambió por completo al agregar VPA+VCR subletal, observándose un incremento de la proporción de células

con colapso del PMM. Encontramos además, que al agregar VPA+VCR subletal se incrementó la masa mitocondrial, se desorganizó por completo el CPNM, provocando una redistribución de las mitocondrias hacia la periferia celular. Es decir que el incremento de potencia relativa de TOA y MG132 por bloqueo de autofagia, se asoció a una acumulación de mitocondrias en falla y una desorganización del CPNM. Por último demostramos la colocalización de mitocondrias y autofagosomas al tratar con VPA, y el incremento sustancial de esta colocalización con el agregado de VPA y VCR. Por otra parte, demostramos que la inmunomarcación de BNIP3 también colocalizó con las mitocondrias. Es decir que la resistencia al TOA y MG132 ocurrió por autofagia de mitocondrias (mitofagia), una situación en la que prevalece el rol promotor de la supervivencia de BNIP3 (recientemente confirmado como un receptor de mitofagia fundamental en la respuesta a la hipoxia). Sin embargo al bloquear el flujo mitofágico, y provocar la acumulación de mitocondrias dañadas, la expresión de BNIP3 y su localización mitocondrial tendría un rol promotor de la muerte celular, actuando como proteína proapoptótica. Es decir que los dos roles de BNIP3 que han sido motivo de controversia, encuentran una explicación en contextos fisiológicos distintos. Como respuesta de estrés protectora frente a una cierta intensidad de la noxa, y un flujo mitofágico capaz de evitar la acumulación de mitocondrias dañadas, y como factor promotor de la muerte celular una vez que esta respuesta de supervivencia ha sido superada.

Por último evaluamos los cambios en la potencia citotóxica de TOA y MG132 en forma individual y combinada, en células de pacientes con neoplasias hematológicas. Encontramos que las drogas combinadas presentan antagonismo, que puede ser transformado en sinergismo mediante el agregado de concentraciones subletales de VPA y VCR.

7 Referencias

Al-Mehdi AB, Pastukh VM, Swiger BM, Reed DJ, Patel MR, Bardwell GC, *et al.* (2010). Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Sci Signal* **5**(231): ra47.

Amenta JS, Sargus MJ, Baccino FM (1977). Effect of microtubular or translational inhibitors on general cell protein degradation. Evidence for a dual catabolic pathway. *The Biochemical journal* **168**(2): 223-227.

Armand JP, Burnett AK, Drach J, Harousseau JL, Lowenberg B, San Miguel J (2007). The emerging role of targeted therapy for hematologic malignancies: update on bortezomib and tipifarnib. *Oncologist* **12**(3): 281-290.

Azad MB, Chen Y, Henson ES, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, *et al.* (2008). Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* **4**(2): 195-204.

Bacon AL, Fox S, Turley H, Harris AL (2007). Selective silencing of the hypoxia-inducible factor 1 target gene BNIP3 by histone deacetylation and methylation in colorectal cancer. *Oncogene* **26**(1): 132-141.

Baetz D, Regula KM, Ens K, Shaw J, Kothari S, Yurkova N, *et al.* (2005). Nuclear factor-kappaB-mediated cell survival involves transcriptional silencing of the mitochondrial death gene BNIP3 in ventricular myocytes. *Circulation* **112**(24): 3777-3785.

Battin EE, Brumaghim JL (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics* **55**(1): 1-23.

Belinsky SA, Grimes MJ, Picchi MA, Mitchell HD, Stidley CA, Tesfaigzi Y, *et al.* (2011). Combination therapy with vidaza and entinostat suppresses tumor growth and reprograms the epigenome in an orthotopic lung cancer model. *Cancer Res* **71**(2): 454-462.

Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, *et al.* (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**(10): 2570-2581.

Berghe TV, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, *et al.* (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* **17**(6): 922-930.

Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ (2011). Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol* **731**: 421-434.

Blair IA (2006). Endogenous glutathione adducts. *Current drug metabolism* **7**(8): 853-872.

Burton TR, Gibson SB (2009). The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death. *Cell Death Differ* **16**(4): 515-523.

Burton TR, Henson ES, Baijal P, Eisenstat DD, Gibson SB (2006). The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. *Int J Cancer* **118**(7): 1660-1669.

Busch C, Geisler J, Knappskog S, Lillehaug JR, Lonning PE (2010). Alterations in the p53 pathway and p16INK4a expression predict overall survival in metastatic melanoma patients treated with dacarbazine. *J Invest Dermatol* **130**(10): 2514-2516.

Cameron DA, Ritchie AA, Miller WR (2001). The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and response to tamoxifen. *Eur J Cancer* **37**(12): 1545-1553.

Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* **269**(1): 7-17.

Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of leukocyte biology* **55**(2): 253-258.

Casarett LJ, Doull J, Klaassen CD (2008). *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons*. 7th edn. McGraw-Hill: New York.

Castaneda CA, Gomez HL (2009). Targeted therapies: Combined lapatinib and paclitaxel in HER2-positive breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **6**(6): 308-309.

Cavaliere V, Lombardo T, Costantino SN, Kornbliht L, Alvarez EM, Blanco GA (2014). Synergism of arsenic trioxide and MG132 in Raji cells attained by targeting BNIP3, autophagy, and mitochondria with low doses of valproic acid and vincristine. *Eur J Cancer* **50**(18): 3243-3261.

Cavaliere V, Papademetrio DL, Alvarez EM, Blanco GA (2010). Haemostatic and immune role of cellular clotting in the sipunculan *Themiste petricola*. *Cell Tissue Res* **339**(3): 597-611.

Cavaliere V, Papademetrio DL, Lorenzetti M, Valva P, Preciado MV, Gargallo P, *et al.* (2009). Caffeic Acid Phenylethyl Ester and MG-132 Have Apoptotic and Antiproliferative Effects on Leukemic Cells But Not on Normal Mononuclear Cells. *Transl Oncol* **2**(1): 46-58.

Celik I, Gallicchio L, Boyd K, Lam TK, Matanoski G, Tao X, *et al.* (2008). Arsenic in drinking water and lung cancer: a systematic review. *Environ Res* **108**(1): 48-55.

Cerda Zolezzi P, Fernandez T, Aulicino P, Cavaliere V, Greczanik S, Caldas Lopes E, *et al.* (2005). Ligaria cuneifolia flavonoid fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multidrug resistant cells. *Immunobiology* **209**(10): 737-749.

Circu ML, Aw TY (2008). Glutathione and apoptosis. *Free radical research* **42**(8): 689-706.

Citri A, Kochupurakkal BS, Yarden Y (2004). The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* **3**(1): 51-60.

Chanan-Khan AA, Borrello I, Lee KP, Reece DE (2010). Development of target-specific treatments in multiple myeloma. *Br J Haematol* **151**(1): 3-15.

Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, *et al.* (1999). Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* **274**(1): 7-10.

Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, *et al.* (1996). In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* **88**(3): 1052-1061.

Chen S, Blank JL, Peters T, Liu XJ, Rappoli DM, Pickard MD, *et al.* (2010). Genome-wide siRNA screen for modulators of cell death induced by proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Res* **70**(11): 4318-4326.

Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell death and differentiation* **16**(7): 1040-1052.

Chou TC (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* **70**(2): 440-446.

Chou TC, Talalay P (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55.

Chou WC, Dang CV (2005). Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies. *Current opinion in hematology* **12**(1): 1-6.

Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, *et al.* (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nature cell biology* **15**(10): 1197-1205.

Dai Y, Rahmani M, Grant S (2003). Proteasome inhibitors potentiate leukemic cell apoptosis induced by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol through a SAPK/JNK- and NF-kappaB-dependent process. *Oncogene* **22**(46): 7108-7122.

Dancey JE, Chen HX (2006). Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* **5**(8): 649-659.

Dasmahapatra G, Rahmani M, Dent P, Grant S (2006). The tyrophostin adaphostin interacts synergistically with proteasome inhibitors to induce apoptosis in human leukemia cells through a reactive oxygen species (ROS)-dependent mechanism. *Blood* **107**(1): 232-240.

De Duve C, Wattiaux R (1966). Functions of lysosomes. *Annual review of physiology* **28**: 435-492.

Derezini M, Brighenti E, Donati G, Vici M, Ceccarelli C, Santini D, *et al.* (2009). The p53-mediated sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents is conditioned by the status of the retinoblastoma protein. *J Pathol* **219**(3): 373-382.

Deretic V, Saitoh T, Akira S (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology* **13**(10): 722-737.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, *et al.* (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* **171**(2): 513-524.

Ding WX, Yin XM (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* **393**(7): 547-564.

Duan XF, Wu YL, Xu HZ, Zhao M, Zhuang HY, Wang XD, *et al.* (2010). Synergistic mitosis-arresting effects of arsenic trioxide and paclitaxel on human malignant lymphocytes. *Chem Biol Interact* **183**(1): 222-230.

Emadi A, Gore SD (2010). Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. *Blood Rev* **24**(4-5): 191-199.

Eriksen KW, Sondergaard H, Woetmann A, Krejsgaard T, Skak K, Geisler C, *et al.* (2009). The combination of IL-21 and IFN-alpha boosts STAT3 activation, cytotoxicity and experimental tumor therapy. *Mol Immunol* **46**(5): 812-820.

Erkan M, Kleeff J, Esposito I, Giese T, Ketterer K, Buchler MW, *et al.* (2005). Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene* **24**(27): 4421-4432.

Facoetti A, Ranza E, Nano R (2008). Proliferation and programmed cell death: role of p53 protein in high and low grade astrocytoma. *Anticancer Res* **28**(1A): 15-19.

Fader CM, Colombo MI (2006). Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* **2**(2): 122-125.

Favoni RE, Florio T (2011). Combined chemotherapy with cytotoxic and targeted compounds for the management of human malignant pleural mesothelioma. *Trends Pharmacol Sci* **32**(8): 463-479.

Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR (2002). Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochemical pharmacology* **64**(5-6): 1057-1064.

Foye WO (1995). *Cancer chemotherapeutic agents*. edn. American Chemical Society: Washington, DC.

Frazier DP, Wilson A, Graham RM, Thompson JW, Bishopric NH, Webster KA (2006). Acidosis regulates the stability, hydrophobicity, and activity of the BH3-only protein Bnip3. *Antioxidants & redox signaling* **8**(9-10): 1625-1634.

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, Kroemer G (2016). Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **73**(11-12): 2405-2410.

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, *et al.* (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation* **22**(1): 58-73.

Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G (2014). Metabolic control of autophagy. *Cell* **159**(6): 1263-1276.

García-Manero G (2011). *Therapeutic Modalities and New Molecular Targets in MDS*. edn, vol. Chapter 14. Springer London, UK.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E (2008). BNIP3 expression in endometrial cancer relates to active hypoxia inducible factor 1alpha pathway and prognosis. *J Clin Pathol* **61**(2): 217-220.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sowter HM, Sivridis E, Gibson S, Gatter KC, *et al.* (2004). BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **10**(16): 5566-5571.

Goodman LS, Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC (2010). *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 12th edn. McGraw-Hill: New York.

Gottlieb RA, Gustafsson AB (2011). Mitochondrial turnover in the heart. *Biochim Biophys Acta* **1813**(7): 1295-1301.

Goussetis DJ, Altman JK, Glaser H, McNeer JL, Tallman MS, Platanias LC (2010). Autophagy is a critical mechanism for the induction of the antileukemic effects of arsenic trioxide. *J Biol Chem* **285**(39): 29989-29997.

Gozuacik D, Kimchi A (2007). Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* **78**: 217-245.

Gross-Goupil M, Escudier B (2010). [Targeted therapies: sequential and combined treatments]. *Bull Cancer* **97**: 65-71.

Gustafsson AB (2011). Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatric cardiology* **32**(3): 267-274.

Hallmann A, Milczarek R, Lipinski M, Kossowska E, Spodnik JH, Wozniak M, *et al.* (2004). Fast perinuclear clustering of mitochondria in oxidatively stressed human choriocarcinoma cells. *Folia Morphol (Warsz)* **63**(4): 407-412.

Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, *et al.* (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* **14**(1): 146-157.

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, *et al.* (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495**(7441): 389-393.

Han SS, Kim K, Hahm ER, Park CH, Kimler BF, Lee SJ, *et al.* (2005). Arsenic trioxide represses constitutive activation of NF-kappaB and COX-2 expression in human acute myeloid leukemia, HL-60. *J Cell Biochem* **94**(4): 695-707.

Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep* **22**(1): 215-221.

Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson AB (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J Biol Chem* **287**(23): 19094-19104.

Hedley DW, Chow S (1994). Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* **15**(4): 349-358.

Heller G, Schmidt WM, Ziegler B, Holzer S, Mullauer L, Bilban M, *et al.* (2008). Genome-wide transcriptional response to 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin a in multiple myeloma cells. *Cancer Res* **68**(1): 44-54.

Hu J, Liu YF, Wu CF, Xu F, Shen ZX, Zhu YM, *et al.* (2009). Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3342-3347.

Isakson P, Bjoras M, Boe SO, Simonsen A (2010). Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* **116**(13): 2324-2331.

Ishida M, Sunamura M, Furukawa T, Akada M, Fujimura H, Shibuya E, *et al.* (2007). Elucidation of the relationship of BNIP3 expression to gemcitabine chemosensitivity and prognosis. *World J Gastroenterol* **13**(34): 4593-4597.

Izeradjene K, Douglas L, Tillman DM, Delaney AB, Houghton JA (2005). Reactive oxygen species regulate caspase activation in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res* **65**(16): 7436-7445.

Jazwinski SM (2013). The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. *Biochimica et biophysica acta* **1833**(2): 400-409.

Jia L, Gopinathan G, Sukumar JT, Gribben JG (2012). Blocking autophagy prevents bortezomib-induced NF-kappaB activation by reducing I-kappaBalpha degradation in lymphoma cells. *PLoS One* **7**(2): e32584.

Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, Tatton WG, Waxman S (1999). Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* **94**(6): 2102-2111.

Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* **24**(6): 980-991.

Karch J, Molkenin JD (2015). Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak. *Circulation research* **116**(11): 1800-1809.

Karp JE, Lancet JE (2005). Development of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib for therapy of hematologic malignancies. *Future Oncol* **1**(6): 719-731.

Kchour G, Tarhini M, Kooshyar MM, El Hajj H, Wattel E, Mahmoudi M, *et al.* (2009). Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* **113**(26): 6528-6532.

Kim D, Cheng GZ, Lindsley CW, Yang H, Cheng JQ (2005). Targeting the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* **6**(12): 1250-1258.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, *et al.* (2016a). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**(1): 1-222.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, *et al.* (2016b). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**(1): 1-222.

Klosowska-Wardegga A, Hasumi Y, Ahgren A, Heldin CH, Hellberg C (2010). Combination therapy using imatinib and vatalanib improves the therapeutic efficiency of paclitaxel towards a mouse melanoma tumor. *Melanoma Res.*

Kloss A, Meiners S, Ludwig A, Dahlmann B (2013). Multiple cardiac proteasome subtypes differ in their susceptibility to proteasome inhibitors. *Cardiovasc Res* **85**(2): 367-375.

Komarova NL, Boland CR (2013). Cancer: calculated treatment. *Nature* **499**(7458): 291-292.

Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA (2002). Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 12825-12830.

Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB (2007). Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem J* **405**(3): 407-415.

Kumar S, Rajkumar SV (2008). Many facets of bortezomib resistance/susceptibility. *Blood* **112**(6): 2177-2178.

Labbadia J, Morimoto RI (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual review of biochemistry* **84**: 435-464.

Labbe K, Murley A, Nunnari J (2014). Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annual review of cell and developmental biology* **30**: 357-391.

Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, Petitprez A (2011). Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. *Pharmacol Ther* **131**(1): 80-90.

Lee DH, Goldberg AL (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**(10): 397-403.

Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP (2010). Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* **189**(4): 671-679.

Lee SH, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH (2007). Mutational and expressional analysis of BNIP3, a proapoptotic Bcl-2 member, in gastric carcinomas. *Apmis* **115**(11): 1274-1280.

Leo C, Horn LC, Hockel M (2006). Hypoxia and expression of the proapoptotic regulator BNIP3 in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* **16**(3): 1314-1320.

Li L, Meng FY, Fu YB, Cai YX, Sun QX (2007). Effect of bortezomib used alone or in combination with arsenic trioxide on HL-60 cell xenograft in nude mice. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* **27**(10): 1504-1506.

Li L, Wang J, Ye RD, Shi G, Jin H, Tang X, *et al.* (2008a). PML/RARalpha fusion protein mediates the unique sensitivity to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells: Mechanisms involve the impairment of cAMP signaling and the aberrant regulation of NADPH oxidase. *Journal of cellular physiology* **217**(2): 486-493.

Li XX, Tsoi B, Li YF, Kurihara H, He RR (2015). Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **63**(5): 301-311.

Li ZW, Chen H, Campbell RA, Bonavida B, Berenson JR (2008b). NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr Opin Hematol* **15**(4): 391-399.

Lombardo T, Anaya L, Kornblihtt L, Blanco G (2012a). *Median Effect Dose and Combination Index Analysis of Cytotoxic Drugs Using Flow Cytometry*. edn, vol. Chapter 20. Intech Open Publisher Rijeka, Croatia.

Lombardo T, Cavaliere V, Costantino SN, Kornblihtt L, Alvarez EM, Blanco GA (2011). Synergism between arsenite and proteasome inhibitor MG132 over cell death in myeloid leukaemic cells U937 and the induction of low levels of intracellular superoxide anion. *Toxicol Appl Pharmacol* **258**(3): 351-366.

Lombardo T, Cavaliere V, Costantino SN, Kornblihtt L, Alvarez EM, Blanco GA (2012b). Synergism between arsenite and proteasome inhibitor MG132 over cell death in myeloid leukaemic cells U937 and the induction of low levels of intracellular superoxide anion. *Toxicol Appl Pharmacol* **258**(3): 351-366.

Lombardo T, Peralta D, Kornblihtt L, Blanco G (2013). Sipunculan celomocytes increase the resistance to H₂O₂-induced cell death under hypoxia. *ISJ* **11**: 87-102.

Lu D, Bai XC, Gui L, Su YC, Deng F, Liu B, *et al.* (2004). Hydrogen peroxide in the Burkitt's lymphoma cell line Raji provides protection against arsenic trioxide-induced apoptosis via the phosphoinositide-3 kinase signalling pathway. *British journal of haematology* **125**(4): 512-520.

Lu TH, Tseng TJ, Su CC, Tang FC, Yen CC, Liu YY, *et al.* (2014). Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP78/CHOP-regulated pathways. *Toxicology letters* **224**(1): 130-140.

Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Pous C (2013). Autophagy and microtubules - new story, old players. *Journal of cell science* **126**(Pt 5): 1071-1080.

Markovic J, Borrás C, Ortega A, Sastre J, Vina J, Pallardo FV (2007). Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* **282**(28): 20416-20424.

Martinive P, Defresne F, Bouzin C, Saliez J, Lair F, Gregoire V, *et al.* (2006). Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res* **66**(24): 11736-11744.

Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, *et al.* (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology* **189**(2): 211-221.

Mazure NM, Pouyssegur J (2009). Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy* **5**(6): 868-869.

McCall K (2010). Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* **22**(6): 882-888.

McCollum G, Keng PC, States JC, McCabe MJ, Jr. (2005). Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937 myeloid leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* **313**(2): 877-887.

Meister A, Anderson ME (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry* **52**: 711-760.

Michiels S, Potthoff RF, George SL (2011). Multiple testing of treatment-effect-modifying biomarkers in a randomized clinical trial with a survival endpoint. *Stat Med* **30**(13): 1502-1518.

Mitsiades CS, Davies FE, Laubach JP, Joshua D, San Miguel J, Anderson KC, *et al.* (2011). Future directions of next-generation novel therapies, combination approaches, and the development of personalized medicine in myeloma. *J Clin Oncol* **29**(14): 1916-1923.

Momeny M, Zakidizaji M, Ghasemi R, Dehpour AR, Rahimi-Balaei M, Abdolazimi Y, *et al.* (2010). Arsenic trioxide induces apoptosis in NB-4, an acute promyelocytic leukemia cell line, through up-regulation of p73 via suppression of nuclear factor kappa B-mediated inhibition of p73 transcription and prevention of NF-kappaB-mediated induction of XIAP, cIAP2, BCL-XL and survivin. *Med Oncol* **27**(3): 833-842.

Mueller MT, Hermann PC, Witthauer J, Rubio-Viqueira B, Leicht SF, Huber S, *et al.* (2009). Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology* **137**(3): 1102-1113.

Munafo DB, Colombo MI (2001). A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal of cell science* **114**(Pt 20): 3619-3629.

Murai M, Toyota M, Satoh A, Suzuki H, Akino K, Mita H, *et al.* (2005a). Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours. *Br J Cancer* **92**(6): 1165-1172.

Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Sasaki Y, Akino K, *et al.* (2005b). Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* **11**(3): 1021-1027.

Ney PA (2015). Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochimica et biophysica acta* **1853**(10 Pt B): 2775-2783.

Nikesitch N, Tao C, Lai K, Killingsworth M, Bae S, Wang M, *et al.* (2016). Predicting the response of multiple myeloma to the proteasome inhibitor Bortezomib by evaluation of the unfolded protein response. *Blood cancer journal* **6**: e432.

Notte A, Leclere L, Michiels C (2011). Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol* **82**(5): 427-434.

Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF (2008). New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol* **9**(12): 1157-1165.

Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, *et al.* (2008). Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* **112**(6): 2489-2499.

Okami J, Simeone DM, Logsdon CD (2004). Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer Res* **64**(15): 5338-5346.

Olszewska-Slonina D, Drewa T, Musialkiewicz D, Olszewski K (2004). Comparison of viability of B16 and CI S91 cells in three cytotoxicity tests: cells counting, MTT and flow cytometry after cytostatic drug treatment. *Acta Pol Pharm* **61**(1): 31-37.

Ortiz-Lazareno PC, Hernandez-Flores G, Dominguez-Rodriguez JR, Lerma-Diaz JM, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy A, *et al.* (2008). MG132 proteasome inhibitor modulates proinflammatory cytokines production and expression of their receptors in U937 cells: involvement of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Immunology* **124**(4): 534-541.

Packer L, Cadenas E (2007). Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free radical research* **41**(9): 951-952.

Paglin S, Lee NY, Nakar C, Fitzgerald M, Plotkin J, Deuel B, *et al.* (2005). Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res* **65**(23): 11061-11070.

Parzych KR, Klionsky DJ (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* **20**(3): 460-473.

Peng CY, Jiang J, Zheng HT, Liu XS (2010). Growth-inhibiting effects of arsenic trioxide plus epigenetic therapeutic agents on leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma* **51**(2): 297-303.

Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio KO, Kinnula VL (2000). Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **278**(1): C118-125.

Platini F, Perez-Tomas R, Ambrosio S, Tessitore L (2010). Understanding autophagy in cell death control. *Curr Pharm Des* **16**(1): 101-113.

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**(7092): 437-443.

Quinsay MN, Thomas RL, Lee Y, Gustafsson AB (2010). Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy* **6**(7): 855-862.

Raemy E, Martinou JC (2014). Involvement of cardiolipin in tBID-induced activation of BAX during apoptosis. *Chemistry and physics of lipids* **179**: 70-74.

Ramos AM, Aller P (2008). Quercetin decreases intracellular GSH content and potentiates the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide in human leukemia cell lines. *Biochemical pharmacology* **75**(10): 1912-1923.

Ramos AM, Fernandez C, Amran D, Esteban D, de Blas E, Palacios MA, *et al.* (2006). Pharmacologic inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)

decrease glutathione content and sensitize human promonocytic leukemia cells to arsenic trioxide-induced apoptosis. *Journal of cellular physiology* **209**(3): 1006-1015.

Ramos AM, Fernandez C, Amran D, Sancho P, de Blas E, Aller P (2005). Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells. *Blood* **105**(10): 4013-4020.

Ravandi F, Estey E, Jones D, Faderl S, O'Brien S, Fiorentino J, *et al.* (2009). Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin. *J Clin Oncol* **27**(4): 504-510.

Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA (2002). Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. *Circ Res* **91**(3): 226-231.

Rikka S, Quinsay MN, Thomas RL, Kubli DA, Zhang X, Murphy AN, *et al.* (2011). Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover. *Cell Death Differ* **18**(4): 721-731.

Roboz GJ, Ritchie EK, Curcio T, Provenzano J, Carlin R, Samuel M, *et al.* (2008). Arsenic trioxide and low-dose cytarabine in older patients with untreated acute myeloid leukemia, excluding acute promyelocytic leukemia. *Cancer* **113**(9): 2504-2511.

Roccaro AM, Vacca A, Ribatti D (2006). Bortezomib in the treatment of cancer. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **1**(3): 397-403.

Sanchez Y, Simon GP, Calvino E, de Blas E, Aller P (2010). Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumor drugs arsenic trioxide and lonidamine in human myeloid leukemia cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* **335**(1): 114-123.

Sarkar A, Mandal G, Singh N, Sundar S, Chatterjee M (2009). Flow cytometric determination of intracellular non-protein thiols in *Leishmania* promastigotes using 5-chloromethyl fluorescein diacetate. *Experimental parasitology* **122**(4): 299-305.

Senft D, Ronai ZA (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in biochemical sciences* **40**(3): 141-148.

Shaida N, Launchbury R, Boddy JL, Jones C, Campo L, Turley H, *et al.* (2008). Expression of BNIP3 correlates with hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α and the androgen receptor in

prostate cancer and is regulated directly by hypoxia but not androgens in cell lines. *Prostate* **68**(3): 336-343.

Shaw J, Yurkova N, Zhang T, Gang H, Aguilar F, Weidman D, *et al.* (2008). Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF- κ B is essential for basal cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Shiozawa K, Nakanishi T, Tan M, Fang HB, Wang WC, Edelman MJ, *et al.* (2009). Preclinical studies of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) combined with cytosine arabinoside and etoposide for treatment of acute leukemias. *Clin Cancer Res* **15**(5): 1698-1707.

Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* **82**(2): 291-295.

Sims JT, Plattner R (2009). MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**(3): 629-633.

Sington J, Giatromanolaki A, Campo L, Turley H, Pezzella F, Gatter KC (2007). BNIP3 expression in follicular lymphoma. *Histopathology* **50**(5): 555-560.

Sowter HM, Ferguson M, Pym C, Watson P, Fox SB, Han C, *et al.* (2003). Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. *J Pathol* **201**(4): 573-580.

Steinmaus C, Ferreccio C, Acevedo J, Yuan Y, Liaw J, Duran V, *et al.* (2014a). Increased lung and bladder cancer incidence in adults after in utero and early-life arsenic exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **23**(8): 1529-1538.

Steinmaus C, Ferreccio C, Yuan Y, Acevedo J, Gonzalez F, Perez L, *et al.* (2014b). Elevated lung cancer in younger adults and low concentrations of arsenic in water. *Am J Epidemiol* **180**(11): 1082-1087.

Stotland A, Gottlieb RA (2015). Mitochondrial quality control: Easy come, easy go. *Biochimica et biophysica acta* **1853**(10 Pt B): 2802-2811.

Sumi D, Shinkai Y, Kumagai Y (2010). Signal transduction pathways and transcription factors triggered by arsenic trioxide in leukemia cells. *Toxicology and applied pharmacology* **244**(3): 385-392.

Sun QX, Meng FY, Fu YB, Li L, Tian S (2007). [HL-60 cell apoptosis induced by bortezomib alone or in combination with arsenic trioxide in vitro]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* **27**(7): 1022-1025.

Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL, Fala F, Billi AM, Manzoli L, *et al.* (2005). Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *Journal of cellular physiology* **202**(2): 623-634.

Tallarida RJ (2001). Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* **298**(3): 865-872.

Tan EY, Campo L, Han C, Turley H, Pezzella F, Gatter KC, *et al.* (2007). BNIP3 as a progression marker in primary human breast cancer; opposing functions in in situ versus invasive cancer. *Clin Cancer Res* **13**(2 Pt 1): 467-474.

Townsend DM, He L, Hutchens S, Garrett TE, Pazoles CJ, Tew KD (2008). NOV-002, a glutathione disulfide mimetic, as a modulator of cellular redox balance. *Cancer research* **68**(8): 2870-2877.

Trudel S, Li ZH, Rauw J, Tiedemann RE, Wen XY, Stewart AK (2007). Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* **109**(12): 5430-5438.

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, *et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* **27**(2): 433-446.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**(1): 44-84.

Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, *et al.* (2000). BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* **20**(15): 5454-5468.

Vazquez CL, Colombo MI (2009). Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods in enzymology* **452**: 85-95.

Vega MI, Martinez-Paniagua M, Huerta-Yepe S, Gonzalez-Bonilla C, Uematsu N, Bonavida B (2009). Dysregulation of the cell survival/anti-apoptotic NF-kappaB pathway by the novel humanized BM-ca anti-CD20 mAb: implication in chemosensitization. *Int J Oncol* **35**(6): 1289-1296.

Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, *et al.* (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 378-383.

Walter P, Ron D (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**(6059): 1081-1086.

Wang CH, Hsiao CK, Chen CL, Hsu LI, Chiou HY, Chen SY, *et al.* (2007). A review of the epidemiologic literature on the role of environmental arsenic exposure and cardiovascular diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* **222**(3): 315-326.

Wang ZG, Rivi R, Delva L, Konig A, Scheinberg DA, Gambacorti-Passerini C, *et al.* (1998). Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RARalpha independent manner. *Blood* **92**(5): 1497-1504.

Webster KA, Graham RM, Bishopric NH (2005). BNip3 and signal-specific programmed death in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **38**(1): 35-45.

Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Ranftler C, Zerza-Schnitzhofer G (2005). A new multiplex assay allowing simultaneous detection of the inhibition of cell proliferation and induction of cell death. *J Cell Biochem* **96**(1): 1-7.

Woodcock J, Griffin JP, Behrman RE (2011). Development of novel combination therapies. *N Engl J Med* **364**(11): 985-987.

Wright JJ (2010). Combination therapy of bortezomib with novel targeted agents: an emerging treatment strategy. *Clin Cancer Res* **16**(16): 4094-4104.

Wu H, Chen Q (2015). Hypoxia activation of mitophagy and its role in disease pathogenesis. *Antioxidants & redox signaling* **22**(12): 1032-1046.

Xiao G, Tang X, Yao C, Wang C (2011). Potentiation of arsenic trioxide-induced apoptosis by 8-bromo-7-methoxychrysin in human leukemia cells involves depletion of intracellular reduced glutathione. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **43**(9): 712-721.

Xu R, Hu Q, Ma Q, Liu C, Wang G (2014). The protease Omi regulates mitochondrial biogenesis through the GSK3beta/PGC-1alpha pathway. *Cell death & disease* **5**: e1373.

Yan H, Wang YC, Li D, Wang Y, Liu W, Wu YL, *et al.* (2007). Arsenic trioxide and proteasome inhibitor bortezomib synergistically induce apoptosis in leukemic cells: the role of protein kinase Cdelta. *Leukemia* **21**(7): 1488-1495.

Yanamandra N, Colaco NM, Parquet NA, Buzzeo RW, Boulware D, Wright G, *et al.* (2006). Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **12**(2): 591-599.

Zahorowska B, Crowe PJ, Yang JL (2009). Combined therapies for cancer: a review of EGFR-targeted monotherapy and combination treatment with other drugs. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**(9): 1137-1148.

Zanotto-Filho A, Delgado-Canedo A, Schroder R, Becker M, Klamt F, Moreira JC (2010). The pharmacological NFkappaB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation. *Cancer letters* **288**(2): 192-203.

Zhang R, Banik NL, Ray SK (2007a). Combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma suppressed PI3K/Akt survival pathway in glioblastoma T98G cells whereas NF-kappaB survival signaling in glioblastoma U87MG cells for induction of apoptosis. *Neurochem Res* **32**(12): 2194-2202.

Zhang Z, Yang X, Zhang S, Ma X, Kong J (2007b). BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia. *Stroke* **38**(5): 1606-1613.

8 ANEXO I

8.1 Evaluación de interacción de fármacos citotóxicos por el método del índice de combinación utilizando citometría de flujo como método de alto rendimiento

8.1.1 Evaluación de viabilidad mediante citometría de flujo

La fortaleza de la citometría de flujo en comparación con otros métodos disponibles para evaluar la proporción de células vivas y muertas es la exactitud y precisión de evaluación multiparamétrica unicelular. Además existe una gran variedad de sondas fluorescentes que pueden ser elegidas en la evaluación de la viabilidad mediante citometría de flujo. La evaluación mediante estas sondas se basa en las funciones celulares y condiciones biológicas que se conservan en forma diferencial en células vivas y se pierden en las células muertas. Es habitual seleccionar al menos dos sondas de medición de condiciones funcionales independientes. Por ejemplo, una sonda de evaluación de integridad de la membrana de las células y la otra sonda de evaluación de actividad enzimática. Las sondas deben seleccionarse para adecuarse a los requisitos experimentales específicos tales como variabilidad biológica, la duración de los experimentos, el hecho de que las células expuestas a drogas sean adherentes o no adherentes y las líneas de iluminación disponibles en el citómetro de flujo. Algunas sondas pueden ser liberadas después de ser retenidas dentro de las células por un corto tiempo y requieren evaluación inmediata por el citómetro de flujo después de la marcación, mientras que otras pueden mantenerse durante varias horas o pueden incluso mantenerse indefinidamente al permanecer unidas covalentemente a componentes celulares. Además, algunas muestras pueden requerir fijación debido a problemas de riesgo biológico, por lo que otro tipo de sondas debe ser elegido y combinado en estos casos ([De Clerck et al., 1994](#)).

8.1.2 Marcación fluorescente de células vivas y muertas

La viabilidad no se define fácilmente en términos de un parámetro fisiológico o morfológico. Ningún parámetro único define completamente la muerte celular en todos los sistemas; por lo tanto, es a menudo ventajoso utilizar más de un indicador de muerte celular basado en diversos parámetros como el daño de la membrana y la actividad metabólica o enzimática. Un número

considerablemente grande de sondas fluorescentes, dirigidas a evaluar la viabilidad a nivel de células individuales, han sido introducido en los últimos años. Muchas de estas sondas nuevas tienen características que son útiles en circunstancias experimentales particulares. Las dos condiciones más frecuentemente detectadas son la mayor permeabilidad de la membrana celular en las células muertas y la presencia de la actividad enzimática en células vivas. La primera se evalúa con las sondas que se vuelven fluorescentes cuando se unen al ADN, las cuales no son capaces de pasar a través de la membrana de la célula si la permeabilidad selectiva se conserva. Para medir la actividad enzimática de las células vivas, se utilizan sustratos fluorogénicos que sólo son captados y retenidos por las células vivas. Sin embargo otras condiciones que ocurren solamente en células vivas pueden utilizarse para demostrar viabilidad, por ejemplo la oxidación enzimática y la reducción del potencial de membrana mitocondrial (Callewaert *et al.*, 1991). Es importante subrayar este concepto ya que estas sondas son de uso frecuente para la evaluación de las funciones celulares específicas y se puede asumir erróneamente que no tienen ninguna contribución a la evaluación de la viabilidad.

8.1.3 Viabilidad y apoptosis

La mayoría de las drogas citotóxicas específicas han demostrado inducir apoptosis u otros modos de muerte celular regulada, incluyendo la muerte celular autofágica o la necrosis programada. Estos mecanismos de muerte celular, a menudo se contraponen a la necrosis que se produce como una desintegración pasiva, repentina e incontrolada de la célula. Las consecuencias fisiológicas de la apoptosis y necrosis pasiva son diferentes, y por lo tanto es importante determinar el fenotipo de muerte. Cuando se evalúa por citometría de flujo, las células en apoptosis u otras formas de muerte celular regulada muestran una disminución en el volumen celular y la cambios en la dispersión de luz frontal (FSC) y un aumento de la dispersión de la luz lateral (SSC) principalmente debido a los cambios citoplasmáticos y nucleares como blebbing y fragmentaciones nucleares (Dive *et al.*, 1992; Pheng *et al.*, 2000). En cambio la necrosis pasiva a menudo muestra volumen creciente de la célula y aumento del FSC sin cambios en el SSC (Healy *et al.*, 1998). La evaluación de viabilidad después de la exposición de la droga citotóxica no evalúa el fenotipo de la muerte celular. Es así, que cualquier fenotipo de muerte celular se puede inducir por tratamiento farmacológico incluyendo necrosis pasiva (Healy *et al.*, 1998). Sin embargo los estudios que determinan la dosis citotóxica media requieren la exposición a dosis crecientes, desde niveles subletales hasta llegar a las dosis mínimas que producen la muerte celular en el 100% de la población en estudio. En este rango de dosis, los

fenotipos de muerte celular corresponden a muerte regulada /programada y excluye a la necrosis pasiva.

8.1.4 La construcción de una curva dosis-respuesta citotóxica

Teóricamente, si una población de células fuera homogéneamente sensible a la muerte celular inducida por un cierto fármaco, existiría una dosis D en la que la muerte celular se observaría en el 100% de los casos (Casarett *et al.*, 2008). Sin embargo, en cualquier muestra de células tratadas con drogas citotóxicas, una proporción aleatoria de células morirán en dosis inferiores o superiores a D , debido a la variabilidad biológica y experimental. Esta variación al azar sigue una distribución gaussiana (Fig. A.1A, C).

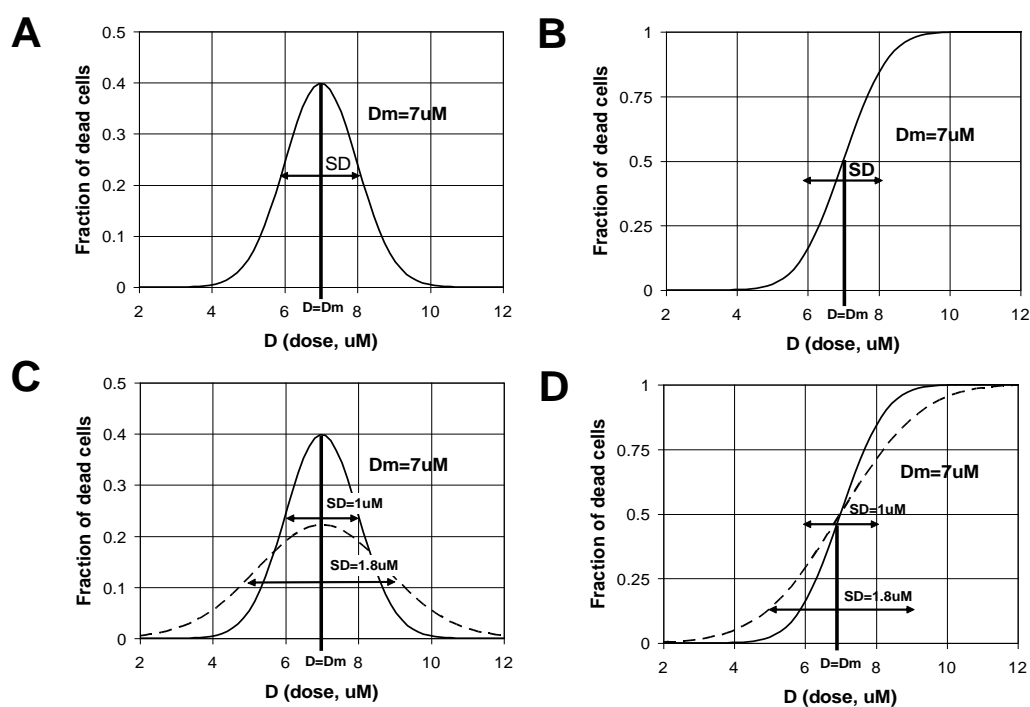


Figura A.1 Modelo dosis-respuesta de tipo cuántico. A. Las células individuales muestran diferencias en la dosis mínima de droga necesaria para inducir la muerte celular. D_m es la dosis mínima más frecuente necesaria para provocar la muerte celular. Las variaciones alrededor de este valor tienen una distribución normal. En este ejemplo particular D_m es $7 \mu\text{M}$ y la desviación estándar (SD) es $1 \mu\text{M}$. B. D_m es la dosis de droga que se estima mata a la mitad de las células en una muestra. Cuando se ejecutan experimentos exponiendo las células a dosis incrementales de una droga citotóxica, la fracción de células muertas presentará una distribución normal acumulativa. C. Se ilustra como dos fármacos citotóxicos difieren en su variabilidad alrededor de la D_m . La droga representada por la línea de puntos tiene mayor variabilidad ($SD = 1,8 \mu\text{M}$) que la droga en línea llena ($SD = 1 \mu\text{M}$). D. Se ilustra como el aumento de la variabilidad alrededor de

D_m determina una curva dosis respuesta con una menor pendiente como se muestra por la línea punteada de la distribución normal acumulativa.

La dosis media D_m representa una dosis D donde la mitad de las células mueren y la mitad de las células siguen vivas (Fig. A.1 B). Sin embargo, como lo indica la forma de la campana de la distribución gaussiana muchas de ese 50% de células que mueren con una dosis D_m puede haber requerido menos de D_m para morir. De hecho como se muestra en la Figura A.1A, sólo una fracción de las células requiere estrictamente una dosis D_m (aquellos casos en la cúspide de la campana), mientras que una minoría de células requiere una dosis mucho más baja que D_m para morir (los casos de la cola izquierda de la curva en forma de campana).

Si llevamos a cabo experimentos que evalúan el efecto citotóxico de dosis crecientes, observamos una curva sigmoidea que sigue una distribución de frecuencia gaussiana acumulativa (Fig. A.1B). Las dosis inferiores a D_m mostrarán disminución en la probabilidad de muerte de la célula acercándose progresivamente al 0%, mientras que las dosis superiores a D_m muestran mayor probabilidad de muerte celular acercándose progresivamente al 100% (Fig. A.1B). Este modelo es conocido como dosis-respuesta cuántico (o cuantal) porque se basa en la evaluación individual de todos los miembros de una población para saber si poseen o no una cierta condición (efecto o respuesta) cuando se aplica una dosis determinada (Casarett *et al.*, 2008). Esto es precisamente lo que se hace a través de la citometría de flujo cuando se evalúa una población de células para identificar si cada una de ellas está viva o muerta luego de ser sometidas a una cierta dosis de un agente citotóxico.

Mediante citometría de flujo, podemos medir la fracción de células muertas (F_a) a una dosis D con alta exactitud y precisión debido al gran número de células analizadas, esto garantiza un muy bajo error estándar (SE). Sin embargo, la alta exactitud y precisión que brinda la técnica se aplican a una sola muestra y no a los replicados. La fuente de variabilidad entre replicados será biológica y experimental. Por ejemplo las células muy crecidas en cultivo pueden responder con mayor variabilidad que las células en crecimiento exponencial cuando se evalúan con replicados. Del mismo modo, los problemas inherentes a la exposición a la droga o el procedimiento de tinción, agregarán la variabilidad a los replicados aunque la precisión y exactitud de la determinación de cada muestra será muy alta debido a la gran cantidad de células evaluada en cada una de ellas. En

cuanto al cálculo de la dosis citotóxica media D_m , estos replicados tendrán un impacto crítico sobre la precisión estadística de la estimación de la D_m .

8.1.5 Cálculo de la dosis media y la ecuación de efecto medio

Las células cultivadas en vitro pueden estar expuestas a dosis crecientes de un fármaco citotóxico durante un cierto intervalo de tiempo (por ej., 48h o 72h) para determinar una dosis citotóxica media D_m . Se deben evaluar varias dosis para cubrir un rango amplio de dosis. Las dosis más bajas deben inducir una fracción de células muertas cercana a aquella de las células no expuestas, mientras que las dosis más altas deben inducir valores de muerte celular que se acercan 100% o alcanzan una meseta de efecto máximo. Entre estas dosis límite, cuantos más puntos evaluemos mayor será la precisión en las estimaciones. Por ejemplo, siete dosis evaluadas por triplicado con fracciones de muerte celular entre 5% y 95% serían suficientes para obtener estimaciones de regresión con una precisión adecuada. La curva sigmoidea de la respuesta de dosis puede ser ajustada a una función logística de dos parámetros del tipo:

$$fa = 1 / [1 + 1 / (D / D_m)^m] \quad (\text{eq. 1})$$

donde D es la dosis, D_m es la dosis necesaria para conseguir el efecto citotóxico medio, fa es la fracción de células muertas, y m es una medida de cuan empinada es la curva sigmoidea (Fig. A.2A). Para estimar la D_m y m la ecuación de efecto medio se escribe como:

$$fa / (1 - fa) = (D / D_m)^m \quad (\text{eq. 2})$$

El factor $(1 - fa)$ es la fracción de células vivas. Aplicando una transformación logarítmica se obtiene la siguiente función lineal:

$$\log (fa/(1-fa)) = m \cdot \log (D) - m \cdot \log (Dm) \quad (\text{eq. 3})$$

Así, al graficar los valores logarítmicos de dosis experimentales contra los valores logarítmicos del cociente células muertas/células vivas, aparecerá una relación lineal que se refiere a menudo como gráfica de efecto medio (Fig. A.2B). Esta es una función lineal del tipo $y = mx + b$, donde $y = fa/(1-fa)$, $x = D$ y $b = -m \cdot \log (Dm)$. Se puede aplicar una regresión lineal a estos datos para obtener las estimaciones de m y Dm . El coeficiente m puede ser fácilmente determinado por la pendiente de la regresión, y Dm se deriva de la estimación de la ordenada al origen $-m \cdot \log(Dm)$.

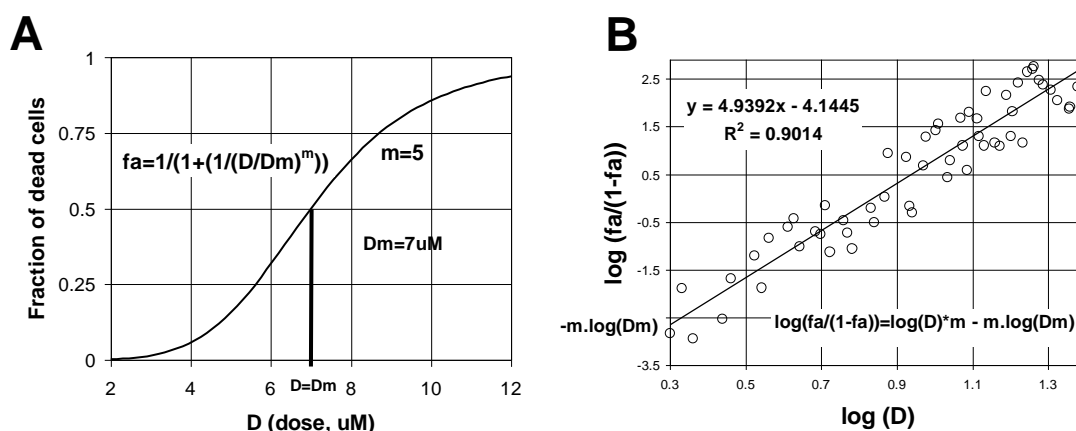


Figura A.2 Gráfica de efecto medio. A La curva sigmoidea dosis-respuesta de dos parámetros (distribución logística) para un caso particular con $Dm = 7\mu\text{M}$ y $m = 5$. B. Transformación algebraica y logarítmica para obtener una función lineal. Una regresión lineal puede aplicarse a datos experimentales con el fin de obtener estimaciones de los dos parámetros Dm y m . El coeficiente de correlación al cuadrado R^2 es una medida de la precisión global de la regresión lineal y por lo tanto de la estimación de la Dm y m .

El valor de R^2 o coeficiente de correlación al cuadrado, es una estimación de la precisión de la regresión general (Fig. A.2B). En esta aplicación particular a los datos que representan muerte celular vs dosis de droga citotóxica, R^2 es afectada principalmente por la dispersión de valores, que a su vez dependen de la variabilidad biológica y experimental. R^2 también es afectada por el número de dosis puntualmente evaluadas entre los valores mínimo y máximo, además del número de replicados. El error estándar (SE) de m y el intercepto también puede obtenerse un análisis de regresión para obtener un intervalo de confianza del 95% alrededor de $\log(Dm)$. La fórmula para el

cálculo manual es algo complicada y requiere calcular el $SE(\log(D))$ cuando $D = D_m$ (se muestra en la ecuación 14, tabla 1), pero puede obtenerse utilizando cualquier software que implemente este cálculo como Calcsyn o Compusyn (Bijnsdorp *et al.*, 2011; Ikeda *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2010).

8.1.6 Dosis umbral, dosis media y eficacia máxima

El análisis de la gráfica dosis-efecto pueden ser informativo sobre valores umbrales y eficacia máxima. En la práctica, el valor umbral es la dosis mínima donde la fracción de células muertas es mayor que la de las células no tratadas o “muerte basal”. La eficacia máxima sería la fracción de células muertas donde la curva sigmoidea se acerca a una meseta. Muy a menudo la eficacia máxima se acerca a 100%. Sin embargo una población celular puede exhibir una respuesta diferencial y una fracción de las células puede requerir dosis bastante mayores. En estos casos la eficacia máxima será mucho menos del 100%.

8.1.7 Comparación de dos drogas

Para comparar dos tratamientos y evaluar si la combinación resulta en sinergismo o no, un primer paso consiste en calcular la D_m para los dos fármacos. Así, debe aplicarse el mismo método descrito anteriormente para la segunda droga. El procedimiento incluirá la evaluación de varias dosis en repeticiones con el mismo intervalo de tiempo de exposición como la primera droga, obtención de datos para crear una gráfica de efecto medio y estimación m y D_m por regresión lineal (Chang *et al.*, 1987; Chou *et al.*, 1984; Sugiyama *et al.*, 1998). Los resultados de la evaluación de los dos fármacos se pueden analizar juntos en una gráfica de efecto medio combinado donde se representan log dosis (en unidades molares) contra $\log(f_a/(1-f_a))$. En este gráfico la **potencia relativa** de los dos fármacos puede ser fácilmente apreciada (Fig. A.3A).

Se dice que un fármaco citotóxico **a** es más potente que un segundo fármaco **b** cuando se requiere menos dosis de **a** para lograr el mismo efecto citotóxico que **b** en una base molar. Además, si las pendientes de los dos fármacos son diferentes sugiere que las drogas tienen diferentes mecanismos para inducir la citotoxicidad.

La ecuación del efecto de dosis puede ser re-escrita mediante una transformación algebraica para calcular la dosis necesaria para inducir un efecto citotóxico dado:

$$D=D_m (f_a/(1-f_a))^{1/m} \quad (\text{eq. 4})$$

Por ejemplo la dosis citotóxica efectiva 50% (CE50) es la dosis D que se estima mata el 50% de las células. En este caso $f_a = 0.5$ y CE50 es coincidente con la dosis media D_m . Del mismo modo CE25 es la dosis D que se estima que mata al 25% de las células.

8.1.8 Evaluación del efecto combinado de dos drogas usando relaciones molares fijas

Una vez obtenida la curva dosis-respuesta de dos fármacos \mathbf{a} y \mathbf{b} , un tercer experimento con combinación de $\mathbf{a} + \mathbf{b}$ será necesario para determinar si la interacción de estas drogas es aditiva, sinérgica o antagónica. Suponiendo que la droga \mathbf{b} es menos potente que el fármaco \mathbf{a} , se puede utilizar una relación molar fija en la combinación, en base a la **potencia relativa** $CE50(\mathbf{a})/CE50(\mathbf{b})$. Por ejemplo, si $CE50(\mathbf{a})$ es $10 \mu\text{M}$ y $CE50(\mathbf{b})$ es de $30 \mu\text{M}$, la relación molar de la combinación la combinación podría ser $1/3$. Una aproximación empírica es empezar el experimento de combinación con una combinación de $\mathbf{a} + \mathbf{b}$ calculada como:

$$CE50(\mathbf{a}+\mathbf{b})=10\{[\log(CE50(\mathbf{a}))+\log(CE50(\mathbf{b}))]/2\} \quad (\text{eq. 5})$$

En el ejemplo este el valor estimado sería $17.3 \mu\text{M}$. Suponiendo que la relación molar fija es $1/3$ esta combinación tendría $4.3 \mu\text{M}$ de la droga \mathbf{a} y $13.0 \mu\text{M}$ de la droga \mathbf{b} . A continuación debemos tratar esta combinación como un nuevo fármaco $\mathbf{a} + \mathbf{b}$ y evaluar varias dosis por encima y por debajo de $17.3 \mu\text{M}$ con replicados para abarcar un amplio rango de dosis de la combinación. De este modo, experimentalmente obtenemos un nuevo conjunto de datos de dosis y efectos citotóxicos que debemos evaluar por el mismo procedimiento con la gráfica de la efecto medio y realizar una regresión lineal para obtener las estimaciones de m y D_m con la combinación de $\mathbf{a} + \mathbf{b}$. En particular obtenemos una ecuación dosis vs efecto como se muestra en la (eq. 4) para determinar la dosis de la combinación $\mathbf{a} + \mathbf{b}$ que se requiere para alcanzar un nivel determinado de efecto citotóxico (CE)

$$D = Dm_{a+b} (fa / (1-fa))^{1/m_{a+b}} \quad (\text{eq. 6})$$

Por ejemplo aplicando la (eq.5) la CE50 (**a + b**) será igual a la dosis media estimada de la regresión en el experimento combinado (Dm_{a+b})

8.1.9 Análisis gráfico

Un primer paso es graficar este resultado de **a+b** junto con los resultados de efectos individuales de las droga **a** y **b** para visualizar la información más relevante (Pegram *et al.*, 1999). Cuando la curva del medicamento combinado se encuentra en un punto medio entre las dos curvas de los fármacos individuales, sugiere un efecto aditivo (Fig. A.3A). Indica que la potencia de los fármacos combinados se encuentra en un punto intermedio entre la **potencia** de cada droga. Cuando la curva de la combinatoria se desplaza a la izquierda, acercándose a la curva de la droga más potente, sugiere sinergismo (Fig. A.3B). Por otro lado, cuando la curva de la droga combinada se desplaza a la derecha, acercándose a la droga de baja potencia, sugiere antagonismo (Fig. A.3C). Otra sugerencia que podría ayudar en la generación de hipótesis es la forma de la curva y particularmente de la pendiente. La variabilidad alrededor de Dm está representada por la desviación estándar (SD) de la distribución gaussiana que subyacen al modelo cuántico dosis-respuesta. Una SD grande está de acuerdo con una curva aplanada mientras que una SD pequeña se asocia a una curva empinada (Fig. A.1, D). Esta variabilidad tiene un significado biológico, y dos fármacos con diferentes mecanismos para inducir muerte celular en una determinada línea celular pueden tener diferentes pendientes. Pero más allá de las propiedades del fármaco, también influyen las respuestas de estrés que se inician en las células tumorales para contrarrestar el efecto citotóxico. Por eso una curva aplanada con una mayor variabilidad en la respuesta, puede ser sugestiva también de una heterogeneidad en la población en estudio para poner en marcha estas respuestas de estrés.

8.1.10 Cálculo del índice de combinación (CI)

El análisis gráfico brinda una cierta orientación sobre qué tipo de interacción resulta de la combinación de fármacos **a** y **b**, y como es afectada la potencia de los fármacos combinados, pero es poco concluyente en términos cuantitativos. Una caracterización numérica más profunda se puede obtener mediante el índice de combinación (Chou, 2010; Chou, 2008). Este índice proporciona una respuesta sobre qué tipo de interacción se produce entre los fármacos **a** y **b** para

cada nivel de efecto. El índice de combinación es definido para un nivel dado de efecto i por la siguiente ecuación:

$$CI(i) = Dac(i) / Das(i) + Dbc(i) / Dbs(i) + \alpha Dac(i) \cdot Dbc(i) / Das(i) \cdot Dbs(i) \quad (\text{eq. 7})$$

Donde el $Dac(i)$ y $Dbc(i)$ son las dosis de los medicamentos **a** y **b** respectivamente requeridos en una combinación **a + b** para producir un nivel de efecto i .

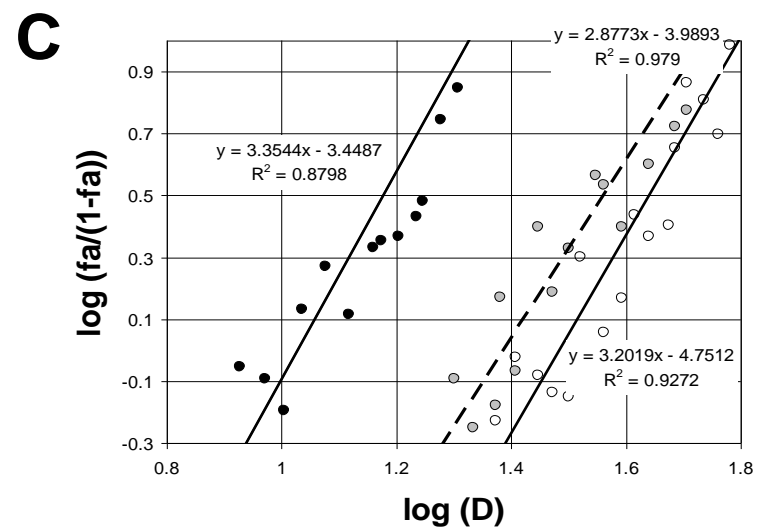
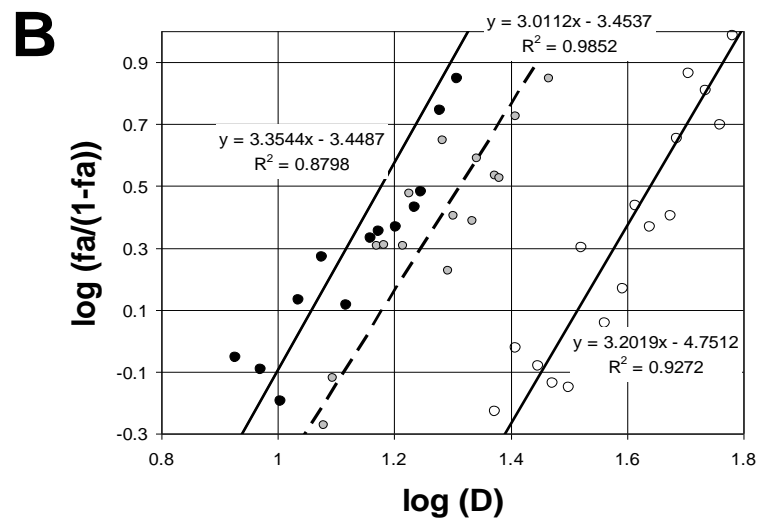
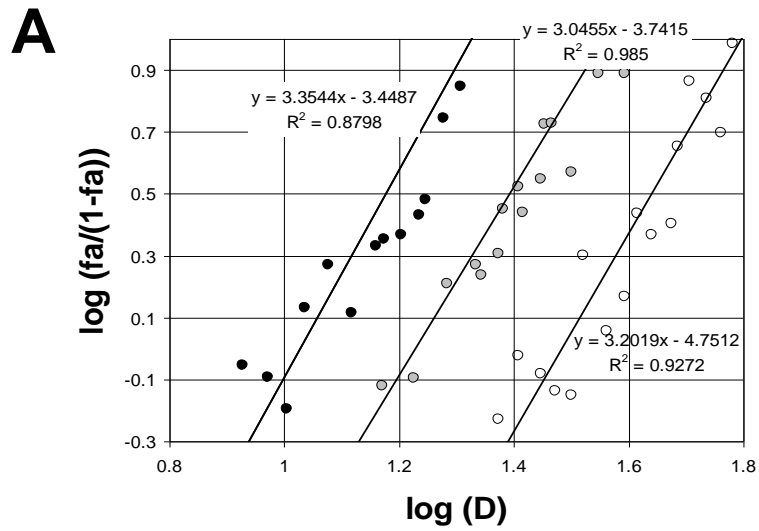


Figura A.3 Interacción de drogas y la gráfica de efecto medio. A. en este ejemplo los valores experimentales están representados por círculos y se aplica la regresión lineal para obtener estimaciones para D_m y m . Los valores experimentales que se obtuvieron para el fármaco **a** se muestran en círculos negros. Los valores de D_m y m para el fármaco **a** fueron $10 \mu\text{M}$ y 3.0 respectivamente. Los valores experimentales para el fármaco **b** (menos potente) se muestran en círculos abiertos. Los valores de D_m y m para el fármaco **b** fueron $30 \mu\text{M}$ y 3.0 respectivamente. Se realizó un experimento combinado con **a + b** usando una relación molar fija $1/3$ basado en $CE50(a)/CE50(b)$ y suponiendo que bajo la hipótesis de un efecto aditivo $CE50(a+b)=10\{[\log(CE50(a))+\log(CE50(b))]/2\}$. En círculos grises se muestran valores experimentales para la combinación. Los valores de D_m y m para la combinación **a + b** fueron $17.0 \mu\text{M}$ y 3.0 respectivamente. En el ejemplo las drogas **a** y **b** tienen una interacción aditiva y la gráfica de efecto medio de la combinación se encuentra en una posición intermedia entre las líneas correspondientes a los fármacos usados en forma individual. B. Se muestra el mismo experimento presentado en A, pero en este caso las drogas **a** y **b** tienen efecto sinérgico. Los valores de D_m y m para la combinación **a + b** fueron $14.0 \mu\text{M}$ y 3.0 respectivamente. La gráfica de efecto medio de la combinación se desplaza hacia la gráfica del fármaco **a**, que tiene la potencia más alta. C. el mismo experimento presentado en A, pero en este caso los fármacos **a** y **b** tienen efecto antagónico. Los valores de D_m y m para la combinación **a + b** fueron $24.4 \mu\text{M}$ y 2.9 respectivamente. La gráfica de efecto medio de la combinación en este caso se desplaza hacia la gráfica del fármaco **b** que tiene la potencia más baja.

$D_{as}(i)$ y $D_{bs}(i)$ son las dosis de los fármacos **a** y **b** respectivamente, requeridas para producir un nivel de efecto i cuando se las utiliza de manera individual. Para cualquier nivel i , estos valores se obtienen de las tres curvas dosis-respuesta de definidas por (eq. 4) (dos individuales y una de la combinación) obtenidas con los parámetros D_m y m , que a su vez se obtuvieron del análisis de regresión con (eq.3) aplicado a los datos experimentales. A menudo se asume un criterio conservador donde las drogas citotóxicas no son mutuamente excluyentes $\alpha=1$. Si las tres líneas son estrictamente paralelas y ambas drogas tienen un blanco molecular similar se podría suponer que son mutuamente excluyentes y en ese caso $\alpha=0$. Si la relación molar fija de fármaco **a** y **b** en el tratamiento combinado es p/q , entonces para un nivel de efecto i :

$$D_{as}(i)=Dm_a (fa(i)/(1-fa(i)))^{1/m_a} \quad (\text{eq. 8})$$

$$D_{bs}(i)=Dm_b (fa(i)/(1-fa(i)))^{1/m_b} \quad (\text{eq. 9})$$

$$Dac(i) = \frac{p}{p+q} Dm_{a+b} \left(\frac{fa(i)}{1-fa(i)} \right)^{1/m_{a+b}} \quad (\text{eq. 10})$$

$$Dbc(i) = \frac{q}{p+q} Dm_{a+b} \left(\frac{fa(i)}{1-fa(i)} \right)^{1/m_{a+b}} \quad (\text{eq. 11})$$

Donde $fa(i)$ es la fracción de células muertas para el nivel de efecto i , Dma y ma son la dosis media y la pendiente calculadas para la droga **a**, Dmb y mb son la dosis media y la pendiente estimada para la droga **b**, y Dm_{a+b} y m_{a+b} son la dosis media y la pendiente estimada para el tratamiento combinado **a+b**. Así se calcula el índice de combinación para cualquier nivel de efecto. La Tabla A.1 resume un cálculo manual de CI de dos fármacos **a** y **b** utilizando estas fórmulas para el nivel de efecto 50% con resultados hipotéticos bajo tres niveles: efecto aditivo, sinérgico o antagónico.

			Three alternative results of the experimental assay with combination a+b (considering $\alpha=1$, mutually non-exclusive condition)		
			Additive	Synergic	Antagonistic
	Single drug a	Single drug b	Combined drugs a+b	Combined drugs a+b	Combined drugs a+b
Dm (uM) ^{#(1)}	10	30	17	14	24.4
m ^{#(1)}	3	3	3	3	3
fa(i)	0.5				
Das(i) ^{#(2)}	10				
Dbs(i) ^{#(3)}		30			
Dac(i) ^{#(4)}			4.25	3.5	6.1
Dbc(i) ^{#(5)}			12.75	10.5	18.3
p/(p+q) ^{#(6)}			0.25	0.25	0.25
q/(p+q) ^{#(6)}			0.75	0.75	0.75
CI (i) ^{#(7)}			1.03	0.82	1.59
$SE(CI(i)) = \left\{ \frac{Dac(i)}{Das(i)} \cdot [SE(Dac(i)/Dac(i) + SE(Das(i)/Das(i))]^2 + \left[\frac{Dbc(i)}{Dbs(i)} \cdot [SE(Dbc(i)/Dbc(i) + SE(Dbs(i)/Dbs(i))]^2 \right]^{1/2} \right.}$ <p style="text-align: right;">(eq. 12)</p>					
$SE(D) = 1/2 \cdot \left\{ 10^{[\log(D)+SE(\log(D))]} - 10^{[\log(D)-SE(\log(D))]} \right\}$ <p style="text-align: right;">(eq. 13)</p>					
$SE(\log(D)) = \left\{ \log(D) \cdot [SE(b)/\log(fa/(1-fa)-b)]^2 + [SE(m)/m]^2 + 2[-(\log D)]^{1/2} \cdot SE(m)/SE(b) \right\} \cdot SE(b)/b \cdot SE(m)/m^{1/2}$ <p style="text-align: right;">(eq. 14)</p>					
where b=-m.log(Dm)					
A 95% confidence interval around D in general and around Dm in particular, can be computed using the formulas for standard error (SE, eq. 13 and eq. 14).					
A 95% confidence interval around CI at any effect level i can be computed from the standard error formulas presented in eq. 12, 13, and 14.					

(1) Obtained from linear regression of experimental data

(2) $Das(i) = Dm_a (fa(i)/(1-fa(i)))^{1/m_a}$

(3) $Dbs(i) = Dm_b (fa(i)/(1-fa(i)))^{1/m_b}$

(4) $Dac(i) = p/(p+q) Dm_{a+b} (fa(i)/(1-fa(i)))^{1/m_{a+b}}$

(5) $Dbc(i) = q/(p+q) Dm_{a+b} (fa(i)/(1-fa(i)))^{1/m_{a+b}}$

(6) Molar ratio p/q = Dm(a) /Dm(b) = 10/30 = 1/3

(7) $CI(i) = Dac(i) /Das(i) + Dbc(i) /Dbs(i) + \alpha Dac(i) \cdot Dbc(i) / Das(i) \cdot Dbs(i)$

Tabla A.1. Cálculo de CI entre dos fármacos a y b para el nivel de efecto 50% bajo tres condiciones alternativas: aditiva, sinérgica y antagónica. Para obtener el CI como una función del nivel de efecto, el cálculo debe repetirse para cada nivel arbitrario i entre 0 y 1. Un intervalo de confianza del 95% alrededor de D en general y alrededor de D_m en particular, puede ser calculado usando las fórmulas para el error estándar (SE, ecuación 12 y la CE. 13). Un intervalo de confianza del 95% alrededor de CI en cualquier nivel de efecto se puede calcular utilizando las fórmulas del error estándar presentadas en las ecuaciones 12, 13 y 14 (extraído de Lombardo et al., 2012a).

El mismo cálculo se puede aplicar a cualquier nivel de efecto para trazar la gráfica del CI en función del nivel de efecto. Cuando la interacción es aditiva $CI = 1$. En este caso puede interpretarse que uno de los fármacos (el menos potente, es decir, el fármaco b en el ejemplo) está actuando como si fuera simplemente una forma diluida de la otra droga (la droga a en el ejemplo). Es por eso que la potencia de a en la combinatoria $a+b$ es equivalente a la potencia que muestra como droga sola y el cociente $D_{ac(i)} / D_{as(i)}$ en la (eq. 7) se acerca a una **potencia relativa de 0.5**. Del mismo modo, el cociente $D_{bc(i)} / D_{bs(i)}$ se acerca a una **potencia relativa de 0.5** y los dos términos sumados se acercan a un $CI=1.0$. Es decir que el CI puede interpretarse esencialmente como la **suma de dos potencias relativas** como se ve en la (eq. 7). La inversa de estas potencias relativas se conoce como **índice de reducción de dosis (DRI)**, que en el caso de interacción aditiva es $1/0.5=2.0$ tanto para la droga a como para la droga b .

Cuando $CI < 1$ la interacción de a con b es sinérgica, mientras que cuando $CI > 1$ la interacción es antagónica. El sinergismo implica que la combinación de los dos fármacos logra un efecto citotóxico mayor que al esperado por la simple adición de los efectos de los fármacos a y b , mientras que el antagonismo alcanza un efecto citotóxico más bajo que el esperado por los efectos acumulativos de fármacos a y b .

La línea horizontal correspondiente al $CI(i) = 1$, donde i es cualquier nivel de efecto en el intervalo (0,1), a menudo se denomina **línea de efecto aditivo**. Una combinación de fármacos a y b puede resultar en valores de CI por encima o debajo de la línea aditiva a niveles diferentes efecto. Así, la CI en función del nivel de efecto no es constante ni lineal y puede aumentar o disminuir (Fig. A.4A). Si los datos de la experiencia de la combinación en el ejemplo de la Figura A.3A resultó en $m a + b = 5$ o $m a + b = 1.8$, incluso con $D_m a + b = 17$, la línea CI estará inclinada hacia abajo ($m=5$) o hacia arriba ($m=1.8$) respectivamente (Fig. A.4A). El resultado es estrictamente aditivo sólo nivel efecto cerca de CE50. Es decir que el aumento de variabilidad en la respuesta citotóxica determina cambios

en la potencia citotóxica relativa medida en diferentes niveles de efecto. Una conclusión importante es que para algunas combinaciones de drogas, los experimentos llevados a cabo a distintos niveles dosis-efecto pueden producir resultados opuestos. Por ejemplo si la combinación **a + b** con $m = 1.8$ que se muestra en la figura 4A se evaluara experimentalmente sólo con una dosis que tuviera nivel efecto 0.25 el análisis concluiría en sinergismo. Sin embargo, si se utilizara una dosis con nivel de efecto 0.75 se concluiría en antagonismo (Fig. A.4A). Esto es un ejemplo de por qué la evaluación del índice de combinación en el rango entero dosis-efecto mostrará la totalidad de interacciones que pueden resultar de la combinación.

Mediante el cálculo del error estándar del CI se pueden trazar intervalos de confianza en todos niveles de efecto ofreciendo una medida de precisión sobre el cómputo del CI. Un intervalo de confianza del 95% indica que si repetimos el experimento 100 veces, 95 de 100 veces la CI estará dentro de este intervalo. Por ejemplo, observando si los límites de confianza están por encima o por debajo de la línea de aditiva permite concluir con mayor precisión acerca del antagonismo o sinergismo. El cálculo del error estándar de CI y los intervalos de confianza en todos los niveles se pudo obtener a través de software especializado como Calcsyn o Compusyn (Bijnsdorp *et al.*, 2011; Chou, 2010). También puede requerir enfoques tales como el método de simulación de Monte Carlo basados en los parámetros estimados por regresión para m y D_m .

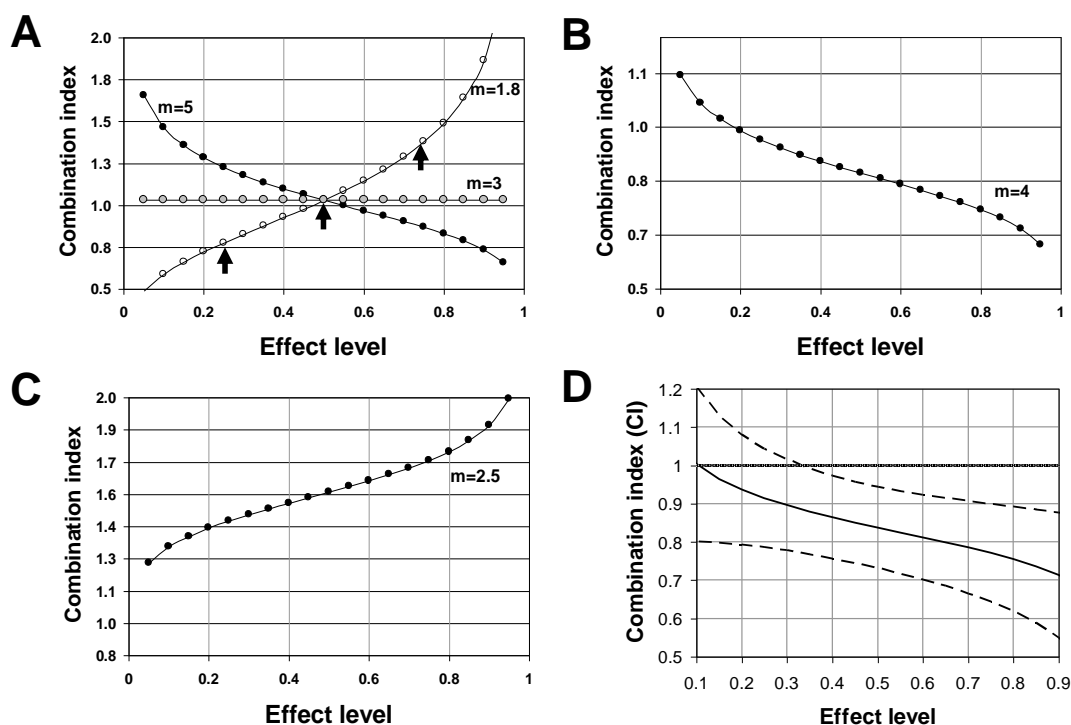


Figura A.4. Interacción de fármacos citotóxicos y cálculo de CI. A. Muy pocas veces el índice de combinación es constante para todos los niveles de efecto. Aquí se muestra cómo diferentes valores de la pendiente m obtenida mediante regresión lineal en el experimento de combinación ($a + b$) afectarían a la forma de la curva que representa el CI como una función del nivel de efecto. Del mismo modo, las diferencias entre las pendientes obtenidas para drogas a y b a través de los experimentos con las drogas en forma individual también contribuirían a la forma irregular de la función de CI. Nótese que dependiendo del nivel de efecto de la combinación $a + b$, para CE25 con $m = 1.8$ sería sinergismo, para CE50 sería aditiva y para CE75 sería antagónica (flechas). B. resultados del cálculo de CI para un ejemplo donde $a + b$ resulta en sinergismo, considerando que se obtuvo $m = 4$ en la regresión del experimento con los fármacos combinados. C. Resultados del cálculo del CI para un ejemplo donde $a + b$ resulta en antagonismo considerando que se obtuvo $m = 2.5$ en la regresión del experimento con los fármacos combinados. D. Intervalos de confianza de nivel 95% alrededor del CI, utilizando una aproximación algebraica (eq 12, Tabla A1) en un ejemplo donde la combinación de $a + b$ es sinérgica.

8.1.11 Comentarios adicionales

Una evaluación exhaustiva de la interacción de drogas es un paso esencial en las terapias dirigidas y combinadas. Los nuevos agentes dirigidos rara vez son útiles como agentes únicos pero pueden ser eficaces cuando se utilizan en combinaciones específicas. El cálculo de efecto medio e índice de combinación son métodos bien fundados y tradicionalmente utilizados en estudios farmacológicos y toxicológicos. Dado que los nuevos medicamentos tienen como blanco los mecanismos capaces de inducir la muerte celular, los biomarcadores relacionados con la evaluación de la viabilidad son preferibles a los marcadores biológicos de proliferación celular. La citometría de flujo es una tecnología ideal para proporcionar los datos masivos de biomarcadores de muerte celular que permitan construir curvas de dosis respuesta de efecto citotóxico. Cuando además se utilizan estos datos para determinar el índice de combinación, se obtiene una caracterización completa de la interacción de las drogas sobre el efecto citotóxico en todos los niveles de efecto. Este enfoque se puede aplicar a líneas celulares tumorales en estudios preclínicos y también en células tumorales derivadas de pacientes, proporcionando información útil como indicadores prospectivos de la potencial respuesta terapéutica al tratamiento antitumoral con drogas combinadas.

8.1.12 Referencias Anexo I

Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ (2011). Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol* **731**: 421-434.

Callewaert DM, Radcliff G, Waite R, LeFevre J, Poulik MD (1991). Characterization of effector-target conjugates for cloned human natural killer and human lymphokine activated killer cells by flow cytometry. *Cytometry* **12**(7): 666-676.

Casarett LJ, Doull J, Klaassen CD (2008). *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons*. 7th edn. McGraw-Hill: New York.

Chang TT, Gulati S, Chou TC, Colvin M, Clarkson B (1987). Comparative cytotoxicity of various drug combinations for human leukemic cells and normal hematopoietic precursors. *Cancer Res* **47**(1): 119-122.

Chou TC (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* **70**(2): 440-446.

Chou TC (2008). Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk Lymphoma* **49**(11): 2059-2080.

Chou TC, Talalay P (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55.

De Clerck LS, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stevens WJ (1994). Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *Journal of immunological methods* **172**(1): 115-124.

Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et biophysica acta* **1133**(3): 275-285.

Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP (1998). Apoptosis and necrosis: mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney international* **54**(6): 1955-1966.

Ikeda H, Taira N, Nogami T, Shien K, Okada M, Shien T, *et al.* (2011). Combination treatment with fulvestrant and various cytotoxic agents (doxorubicin, paclitaxel, docetaxel, vinorelbine, and 5-fluorouracil) has a synergistic effect in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Sci*.

Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, *et al.* (1999). Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* **18**(13): 2241-2251.

Pheng S, Chakrabarti S, Lamontagne L (2000). Dose-dependent apoptosis induced by low concentrations of methylmercury in murine splenic Fas+ T cell subsets. *Toxicology* **149**(2-3): 115-128.

Ramachandran C, Resek AP, Escalon E, Aviram A, Melnick SJ (2010). Potentiation of gemcitabine by Turmeric Force in pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep* **23**(6): 1529-1535.

Sugiyama K, Shimizu M, Akiyama T, Ishida H, Okabe M, Tamaoki T, *et al.* (1998). Combined effect of navelbine with medroxyprogesterone acetate against human breast carcinoma MCF-7 cells in vitro. *Br J Cancer* **77**(11): 1737-1743.