



Cirigliano, Stéfano Martín

Efecto del péptido sintético CIGB-300 en vías de señalización dependientes de CK2 : implicancia en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas en un modelo preclínico



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Cirigliano, S. M. (2018). *Efecto del péptido sintético CIGB-300 en vías de señalización dependientes de CK2. Implicancia en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas en un modelo preclínico. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/782>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Efecto del péptido sintético CIGB-300 en vías de señalización dependientes de CK2. Implicancia en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas en un modelo preclínico.

TESIS DOCTORAL

Stéfano Martín Cirigliano

smcirigliano@gmail.com

Resumen

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en nuestro país y en el mundo. Más del 80% de los casos corresponden al subtipo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). El cisplatino continúa siendo el estándar de tratamiento quimioterapéutico a pesar de su limitada eficacia, consecuencia tanto de la resistencia intrínseca como adquirida que presenta.

La CK2 es una Ser/Thr quinasa que se encuentra sobre-expresada en varios tipos de tumores, incluido el cáncer de pulmón, donde cumple un rol muy importante en la supervivencia y en el bloqueo de la apoptosis. CIGB-300 es un péptido sintético con acción antitumoral que presenta un novedoso mecanismo de acción, dado que es capaz de unirse a los sustratos de CK2 y de prevenir la actividad de la enzima. El objetivo de la presente tesis consistió en analizar los efectos de CIGB-300 sobre vías de señalización dependientes de CK2 en líneas celulares de NSCLC y estudiar de qué manera su bloqueo puede contribuir a mejorar los tratamientos actuales.

Hemos demostrado que CIGB-300 induce una respuesta anti-proliferativa tanto en cultivos en monocapa como en modelos tridimensionales de células NSCLC, presentando en estos últimos una rápida y efectiva internalización.

Este efecto fue acompañado por la inhibición de la vía canónica de NF- κ B, según constatamos mediante la reducción en los niveles nucleares de RelA/p65 en todas las líneas celulares analizadas. La modulación sobre NF- κ B se asoció con un aumento en la actividad del proteasoma, hallándose un vínculo entre CIGB-300 y la subunidad Alpha7/C8 de este complejo. Por otra parte, se observó que CIGB-300 fue capaz de alterar el eje Wnt/ β -catenina, aunque sólo en el contexto de estimulación de esta vía.

Puesto que la activación de NF- κ B ha sido vinculada con la inducción de resistencia a cisplatino, exploramos si CIGB-300 podría aportar un beneficio adicional al tratamiento estándar con este quimioterápico. Para tal fin establecimos con éxito un modelo de resistencia al cisplatino que presentó niveles incrementados de p65 nuclear luego de la exposición al quimioterápico.

De manera notable, la dependencia adquirida a la vía de NF- κ B hizo que la línea cisplatino-resistente sea más sensible al tratamiento con CIGB-300.

En conclusión, nuestros resultados aportan nueva información al mecanismo de acción de CIGB-300 y sugieren potenciales usos clínicos para la terapia de pacientes NSCLC.

Abstract

Lung cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer-related deaths worldwide. Up to 80% of cancer patients are classified as non-small-cell lung cancer (NSCLC) and cisplatin remains as the gold standard chemotherapy treatment, despite its limited efficacy due to both intrinsic and acquired resistance.

The CK2 is a Ser/Thr kinase overexpressed in various types of cancer, including lung cancer. CIGB-300 is an antitumour peptide with a novel mechanism of action, since it binds to CK2 substrates thus preventing the enzyme activity. The aim of this work was to analyze the effects of CIGB-300 treatment targeting CK2-dependent signaling pathways in NSCLC cell lines and whether it may help improve current

chemotherapy treatment. For this purpose, the human NSCLC cell lines NCI-H125 and NIH-A549 were used.

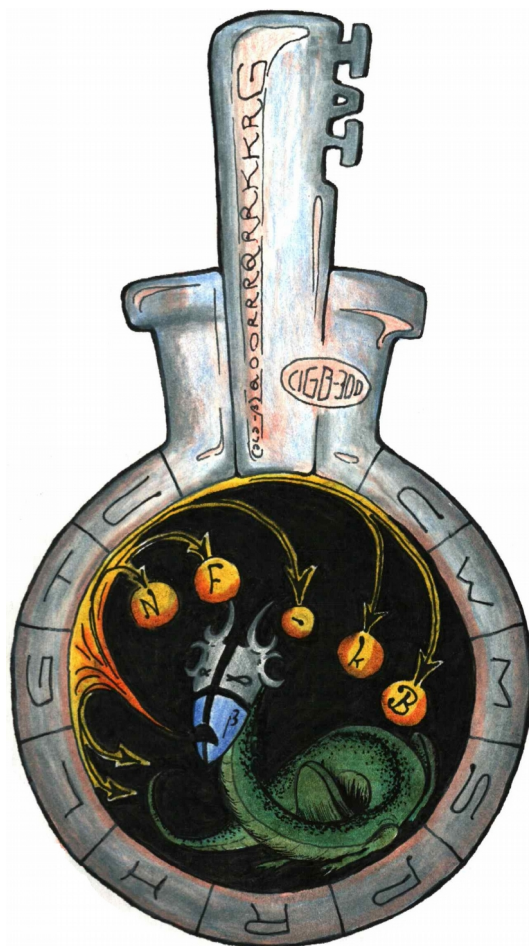
We demonstrated that CIGB-300 induces an anti-proliferative response both in monolayer and three-dimensional NSCLC models, presenting rapid and complete peptide uptake. This effect was accompanied by the inhibition of the CK2-dependent canonical NF- κ B pathway, evidenced by reduced RelA/p65 nuclear levels and the modulation of NF- κ B protein targets in both lung cancer cell lines, as well as conditionally reduced NF- κ B transcriptional activity. In addition, NF- κ B modulation was associated with enhanced proteasome activity, possibly through the interaction with its α 7/C8 subunit. On the other hand, CIGB-300 was also able to alter the Wnt/ β -catenin pathway, but only when this pathway was previously activated.

Given that NF- κ B activation has been linked to cisplatin-induced resistance, we explored whether CIGB-300 could bring additional therapeutic benefits to the standard cisplatin treatment. We established a resistant cell line that showed higher p65 nuclear levels after cisplatin treatment as compared with the parental cell line. Remarkably, the acquired NF- κ B pathway dependence made the cisplatin-resistant cell line more sensitive to CIGB-300 treatment.

In conclusion, our data provide new insights into CIGB-300 mechanism of action and suggest clinical potential on current NSCLC therapy.

Efecto del péptido sintético CIGB-300 en vías de señalización dependientes de CK2.

Implicancia en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas en un modelo preclínico.



Tesis de doctorado

Marzo de 2017

Doctorando: Lic. Stéfano M. Cirigliano

Director: Dr. Alejandro J. Urtreger

Lugar de trabajo: Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"

(Arte de tapa: Ing. Fabián Leonardo Santillán.)



*“Después de todo tú eres,
la única muralla.
Si no te saltas nunca darás
un solo paso.”
Luis Alberto Spinetta.-*

Este obra está bajo una
Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 3.0 Unported.



*A padre, por
la curiosidad.
A madre, por
la dedicación.*

Prefacio

La presente tesis doctoral fue realizada en el período comprendido entre 2012 y 2017 en el Área de Investigación del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” (IOAHR). Para tal fin el autor contó con una beca AGENCIA de nivel inicial (Proyecto PAE: 37011 – PID: 00195, Investigador responsable (IR): Dr. Daniel Alonso) y con una beca interna de CONICET de finalización de doctorado (Resolución D. N°4695 de fecha 9 de diciembre de 2014). A su vez, el proyecto obtuvo financiamiento interno del IOAHR y de los siguientes subsidios del grupo: BID OC-AR PMT-PICT 00487 (2010 – 2012, IR: Urtreger AJ), PIP CONICET (2012 – 2014, IR: Todaro LB), Ministerio de Salud, Instituto Nacional del Cáncer (2012 – 2014, IR: Todaro LB), Ministerio de Salud, Instituto Nacional del Cáncer (2014 – 2016, IR: Urtreger AJ) y PICT-2014-2234 (2014 – 2017, IR: Todaro LB).

Los resultados aquí presentados fueron recientemente aceptados para su publicación en la revista *Cancer Cell International (BioMed Central)*:

- *The synthetic peptide CIGB-300 modulates CK2-dependent signaling pathways affecting the survival and chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines. Cirigliano SM, Díaz Bessone MI, Berardi DE, Flumian C, Bal de Kier Joffé ED, Perea SE, Farina HG, Todaro LB, Urtreger AJ.*

Además, parte del trabajo realizado constituye una colaboración con el laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ y se encuentra actualmente en prensa en la revista *Lung Cancer (doi:10.1016/j.lungcan.2016.05.026)*:

- *CIGB-300, an anti-CK2 peptide, inhibits angiogenesis, tumor cell invasion and metastasis in lung cancer models. Benavent Acero F, Capobianco CS, Garona J, Cirigliano SM, Perera Y, Urtreger AJ, Perea SE, Alonso DF, Farina HG.*

Los resultados obtenidos a lo largo de estos años han sido presentados en los siguientes Congresos nacionales e internacionales:

- XXVIII Jornadas Nacionales De Oncología Del Instituto “Ángel H. Roffo”, Buenos Aires, Argentina. Septiembre de 2012.
- 57° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2012.
- “SPSAS - Advances in Molecular Oncology: Translating Molecular Biology into Cancer Treatment”. San Pablo, Brasil. Febrero de 2013. Apoyo financiero otorgado por FAPESP para participar y trabajo seleccionado para ser presentado en la modalidad de comunicación oral.
- XXIX Jornadas de Oncología del Instituto "Ángel H. Roffo". Buenos Aires, Argentina. Septiembre de 2013.
- Reunión SAIC-SAFIS-SAFE. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2013. Trabajo seleccionado para presentación bajo la modalidad de charla corta en el Simposio “Avances en Oncología”.
- AACR Annual Meeting 2014. San Diego, Estados Unidos. Abril de 2014.
- “The 6th Latin American Conference on Lung Cancer LALCA 2014”. Lima, Perú. Agosto de 2014. Beca de viaje otorgada por “International Association For The Study of Lung Cancer (IASLC)” para asistir al Congreso.
- The Third “South American Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine” (SISTAM 2015). Bariloche, Argentina. Abril de 2015. Trabajo seleccionado para presentación bajo la modalidad de charla corta.
- Reunión SAIC-SAFIS. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2015.

- AACR Annual Meeting 2016. New Orleans, Louisiana, Estados Unidos. Abril de 2016.
- “The 7th Latin American Conference on Lung Cancer LALCA 2016”. Ciudad de Panamá, Panamá. Agosto de 2016. Beca de viaje otorgada por “International Association For The Study of Lung Cancer (IASLC)” para asistir al Congreso.
- XXXI Jornadas Multidisciplinarias de Oncología del Instituto “Ángel H. Roffo” 2016. Comunicación oral durante el Simposio “Nuevas Estrategias Moleculares en Cáncer de Pulmón Avanzado”. Septiembre de 2016.

El autor es Licenciado en Biotecnología por la Universidad Nacional de Quilmes. Otras publicaciones suyas del mismo período son:

- *Modulation of pancreatic tumor potential by overexpression of protein kinase C β 1*. Cirigliano SM, Mauro LV, Grossoni VC, Colombo LL, Diament MJ, Kazanietz MG, Bal de Kier Joffé ED, Puricelli LI, Urtreger AJ. *Pancreas*. 2013 Oct;42(7):1060-9.
- *PKC δ Inhibition Impairs Mammary Cancer Proliferative Capacity But Selects Cancer Stem Cells, Involving Autophagy*. Berardi DE, Flumian C, Rodriguez CE, Díaz Bessone MI, Cirigliano SM, Bal de Kier Joffé ED, Fiszman GL, Urtreger AJ, Todaro LB. *J Cell Biochem*. 2016 Mar;117(3):730-40.

Agradecimientos

Quiero comenzar dándole gracias a la Universidad Nacional de Quilmes por haber sido la Cera de Altos Estudios que me alberga durante estos diez días y me brinda una maravillosa educación, pública, de calidad y gratuita. Estare eternamente en deuda por ella, y con todos aquellos que la hicieron y la hacen posible. En el mismo apartado aprovecho para incluir al laboratorio de Oncología Molecular allí presente, y que me hizo formar parte del proyecto que da origen y sentido a esta tesis. Agradezco por ello a Daniel, y principalmente a Hernán por la oportunidad, pero también por las productivas reuniones científicas que mantuvimos.

Y si mi mente se pierde en elogios hacia mi Universidad, es entonces el Roffo el que ha captado mi espíritu y mi cariño todos estos días. Es de este lugar y de su tradición de servicio e investigación del que tomaré los metros que intentaré llevarme como propios: la dedicación vocacional y la búsqueda de nuevo conocimiento para ayudar a las personas. No puedo imaginarme a otro médico, a otro investigador/a que encarne mejor al Roffo que Elisa. A ella le doy gracias por ser un referente para dos generaciones y por continuar el camino formativo de la Doctora, a quien muchos conocimos a través de su legado. Gracias a Elisa también por las contribuciones constantes a mi formación y a este proyecto, y por el afectuoso apoyo que supo oportunamente brindar.

Nada de lo expuesto en las páginas siguientes sería viable sin el trabajo de todo nuestro grupo, encabezado por Alejandro y Laura. Les agradezco a ambos por haberme hecho parte del mismo. A Alejandro le doy gracias además por haberme transmitido su formación como profesional, que aplicaré todos los días de mi vida en lo que haga. También le agradezco enormemente su obsesiva dedicación y responsabilidad a la hora de ocuparse de nuestro trabajo. Pero le doy gracias sobre todo por la confianza que deposita en mí y por darme sinceramente siempre lo mejor.

A Laura le agradezco también su apoyo necesario, su aporte en la discusión de ideas y su buen juicio en la toma de decisiones. Mis pares del grupo han hecho mucho también por mi formación y les doy tremendas gracias por ello. Gracias a Inés por transmitirme buena parte del trabajo de merada y por la bella y productiva,

aunque insostenible relación de amor/odio que hemos construido. Gracias a Damien por haberme conducido en los primeros pasos también, por estar siempre dispuesto a discutir, por su terna noñez, pero por sobre todo por haberme enseñado a trabajar con alguien tan diferente a mí y mostrarme cuán enriquecedor eso puede resultar. Gracias a Carolina por haber sido una fiel compañera de merada en las épocas donde más falta hace. Le doy gracias también por su buen corazón y por ser consciente con él.

Gracias a todos los investigadores del Área por contribuir a que sea un cálido y servicial lugar de trabajo. Gracias a Ana por querer perseguir lo mejor. Gracias a Lydia por haber estado siempre dispuesta a darme una mano. Muchas gracias a Marina por ser tan linda colega y por mostrarme un lado muy bueno de hacer carrera de investigador científico. Gracias a Stella por contagiarme de ganas de superarme. Gracias a Lucas por su ejemplo de dedicación y fervor. Gracias a Giselle por su crítica honesta y constructiva. Gracias a Eduardo por su compañía. Gracias a Gabriel por tomarse la vida con humor. Gracias a Andrés por su genuino interés en mis cosas. Gracias a Martín por ser tan buen tipo y colaborar en lo que haga falta. Gracias a Miriam por todo lo que hace por nuestro Bioterio.

Estoy muy contento por haber contado durante todo mi doctorado con el área técnica del Roffo y por ello me encuentro sumamente agradecido con quienes la componen. Le agradezco a Alicia por haber puesto a portar muchas de las cosas que usamos todos los días. Le agradezco a Silvina por su seriedad para chequear el trabajo y su predisposición para facilitarme el mío, le doy gracias por ser una buena compañera. Gracias a Gabriela por salvarme todos los días con una sonrisa. Gracias a Leo por ser el primero en llegar, especialmente en aquellos días que supo extenderme un mate después de una noche de tres. Gracias a Darío por su enorme humanidad y por escuchar. Gracias a Antonia y a Mirta.

A esta altura y dada la coyuntura que me toca, se hace difícil que este texto no tome aires de despedida. Es por esta razón que no ahorrare en palabras para transmitir mi gratitud con lo que considero es el pilar del que hacer científico: las relaciones interpersonales y el espíritu colaborativo. Y si Elisa fue el ejemplo perfecto de lo que el Roffo simboliza para mí, hay una entidad dentro del Área que engloba a estos

Agradecimientos

últimos dos ítems, y que, ha sido denominado como Becariato. En mi concepción, Becariato es una generación de jóvenes científicos que tuvieron la suerte de beber buena leche de época y que entienden al que hacer científico como un juego libre de amigos que se ayudan. Gracias a todos los que formaron, forman y formarán parte de esta idea, por que hicieron, hacen y harán que valga para mí el esfuerzo por seguir en esta. Y si bien este grupo trasladando a nuestro Instituto, e inclusive al ambiente de la creación científica (gracias a artistas jóvenes y argentinos como Mi Amigo Invenible, Andrés Ayztruenos y Voli por su inspiración, su compañía y por decorar las páginas de este tesis), voy a enumerar sólo a las personas del mismo para no irme (todavía más) al pasto. No sin antes dar gracias a Alexandra Elbakyan y colaboradores que, desde Rusia y con amor, ayudan a derribar las falsas murallas que en vano intentan cercar el acceso a la información y al conocimiento.

Gracias a Guillermo por su liviana herencia recibida con la creación de los ministerios de uso común y por las técnicas que me enseñó durante el primer

año. Gracias a Amparo por su combatividad por las primeras transformaciones, por la ayuda con los análisis de colocalización. Gracias a Ada por su solidaria compartida pero anda en tan caminos. Gracias a Diego por responder primero cuando se pide ayuda. Gracias a Elena por su hermosa locura, tan envidiable para encantar este trabajo. Gracias a Sara por introducirme en el cultivo de esferoides, por su forma y su simplicidad. Gracias a Rocío(s), por enseñarme tanto de microscopía y análisis de imágenes. Le agradezco además por ser para mí una referencia del pensamiento crítico, feminista y argentino. Gracias a Rocio (T) por estar siempre presente y por ser valiente. Gracias a Cristina (L) por su forma de encarar la vida y por sus consejos en el cultivo 3D. Gracias a Mariana por ser una científica con coraje y buenas ideas. Gracias a Sol por su ayuda con los ensayos de gener reporteros, por poderse hasta tarde y por ser un encanto. Gracias a Lilian por su brutal honestidad científica y su empuje para lograr que muchas de las cosas buenas que pasaban en este lugar se concretaran. Gracias a Gonzalo por haber elegido hacer también ciencia básica. Gracias a Gabriela por ser mi compañera en la Universidad de Buenos Aires. Gracias a Mariela por preocuparse y ocuparse del bien común. Gracias a De-

nise por preocuparse por mí. Gracias a Ximena por tratarme siempre con cariño. Gracias a Catalina por estar pendiente de mi futuro. Gracias a Marcela por emocionarse en una jornada de lucha. Gracias a Chiara, a Lucrecia y a Florencia por su colaboración cada vez que me tocó ir a su laboratorio y por el entretenido Congreso que compartimos. Gracias a Natalia.

Y gracias a los más jóvenes por ser el porvenir. Gracias a Agustina por haber elegido el Roffo. Gracias a Giselle por estar en todos los detalles y aún así pasar desapercibida. Gracias a Julieta por ser parte. Gracias a Aidana por dejar de ser Titi. Gracias a Macarena y a Florencia por ser realmente copades.

Le doy gracias también a los becarios del Laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ por haberme recibido tan gentilmente, especialmente a Mazzareto, a Carla y a Fernando.

Les agradezco inmensamente a mis amigos de siempre, que forman parte de la celofosa de estas horas pero que por impracticables que son, no deben ser nombrados.

Todas las palabras que se me ocurren no bastan para plasmar cuán en deuda estoy con todas estas personas. Y mucho menos para con Jopi. Gracias por todo tu apoyo y todo el aporte que hiciste a mi formación.

Gracias por ser una amiga y una compañera, no sólo para mí, sino también con todo aquel al que creas poder comprender y ayudar.

Gracias por las cientos de horas que pasamos pensando estar juntos. Por los jactitos verdes. Por mostrarme que se puede ser consecuente con uno mismo. Por vivir al Sur, por salvarme la vida. Por tu luz.

Quiero terminar dándole gracias a mi hermano por su constante observación de evidencia, al nano por incluirme siempre en moración y a la nana, por haber sido de una manera tan noble. Hasta pronto.

Stefano -
25 de febrero de 2012.

Índice

Prefacio.....	1
Agradecimientos.....	4
Índice.....	6
Abreviaturas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	11
Introducción.....	13
El cáncer.....	13
Cáncer de pulmón.....	15
Tratamiento del NSCLC.....	17
Proteína quinasa CK2.....	21
Vías de señalización dependientes de CK2.....	27
Eje Wnt/ β -catenina.....	27
Eje NF- κ B canónico.....	30
El complejo del proteasoma.....	34
El péptido CIGB-300.....	36
Hipótesis.....	40
Objetivos.....	40
Materiales y métodos.....	42
Síntesis del péptido CIGB-300.....	42
Reactivos y anticuerpos.....	42
Líneas celulares y condiciones de cultivos.....	43
Tratamientos.....	43
Determinación de la viabilidad celular.....	44
Ensayo de apoptosis.....	44
Secreción de enzimas proteolíticas.....	46
Cultivos 3D y ensayos de internalización del péptido.....	46
Ensayo de migración.....	47
Separación de las fracciones nucleares y citoplasmáticas.....	48
Western Blot (WB).....	49
Ensayo de genes reporteros.....	50
Microscopía de fluorescencia.....	50
Generación de la línea celular resistente al cisplatino.....	51
Ensayo de interacción de drogas.....	51
Determinación de la actividad del proteasoma.....	54
Inmunofluorescencia confocal.....	54
Análisis estadístico.....	57
Resultados.....	58
Capítulo I: modulación del fenotipo maligno.....	58
Efecto anti-proliferativo en líneas celulares de NSCLC.....	58
Análisis del mecanismo de muerte celular.....	59
Efecto antiproliferativo en cultivos 3D.....	61
Estudio de internalización en esferoides.....	63

Índice

Otros efectos asociados con la progresión maligna.....	64
Capítulo II: Vías de señalización dependientes de CK2.....	67
Eje Wnt/ β -catenina.....	67
Eje NF- κ B.....	69
Mecanismos de inhibición de la vía NF- κ B.....	75
Capítulo III: quimiorresistencia en NSCLC.....	81
Cisplatino y NF- κ B.....	81
Generación de una línea NSCLC resistente a cisplatino.....	83
Efecto de CIGB-300 en un contexto de quimiorresistencia.....	87
Discusión.....	95
Conclusiones.....	112
Anexo.....	113
Macros para ImageJ.....	113
Ensayo de interacción de drogas, valores.....	114
Curvas de Kaplan Meier.....	115
Inhibidor de NF- κ B en línea quimiorresistente.....	116
Referencias.....	117
Índice de figuras.....	131

Abreviaturas

BZ: Bortezomib

CI: Índice de combinación

CK2: Proteína Quinasa 2

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

MC: Medio Condicionado

MMP: Metallo-proteasa de matriz

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

NF-κB: Factor nuclear kappa B

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

PI3K: Quinasa de fosfoinositol 3

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

TBB: 4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazol

TKI: Inhibidor de tirosina- quinasas

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa

uPA: Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa

Resumen

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en nuestro país y en el mundo. Más del 80% de los casos corresponden al subtipo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). El cisplatino continúa siendo el estándar de tratamiento quimioterapéutico a pesar de su limitada eficacia, consecuencia tanto de la resistencia intrínseca como adquirida que presenta.

La CK2 es una Ser/Thr quinasa que se encuentra sobre-expresada en varios tipos de tumores, incluido el cáncer de pulmón, donde cumple un rol muy importante en la supervivencia y en el bloqueo de la apoptosis. CIGB-300 es un péptido sintético con acción antitumoral que presenta un novedoso mecanismo de acción, dado que es capaz de unirse a los sustratos de CK2 y de prevenir la actividad de la enzima. El objetivo de la presente tesis consistió en analizar los efectos de CIGB-300 sobre vías de señalización dependientes de CK2 en líneas celulares de NSCLC y estudiar de qué manera su bloqueo puede contribuir a mejorar los tratamientos actuales.

Hemos demostrado que CIGB-300 induce una respuesta anti-proliferativa tanto en cultivos en monocapa como en modelos tridimensionales de células NSCLC, presentando en estos últimos una rápida y efectiva internalización. Este efecto fue acompañado por la inhibición de la vía canónica de NF- κ B, según constatamos mediante la reducción en los niveles nucleares de RelA/p65 en todas las líneas celulares analizadas. La modulación sobre NF- κ B se asoció con un aumento en la actividad del proteasoma, hallándose un vínculo entre CIGB-300 y la subunidad Alpha7/C8 de este complejo. Por otra parte, se observó que CIGB-300 fue capaz de alterar el eje Wnt/ β -catenina, aunque sólo en el contexto de estimulación de esta vía.

Puesto que la activación de NF- κ B ha sido vinculada con la inducción de resistencia a cisplatino, exploramos si CIGB-300 podría aportar un beneficio adicional al tratamiento estándar con este quimioterápico. Para tal fin

Resumen

establecimos con éxito un modelo de resistencia al cisplatino que presentó niveles incrementados de p65 nuclear luego de la exposición al quimioterápico. De manera notable, la dependencia adquirida a la vía de NF- κ B hizo que la línea cisplatino-resistente sea más sensible al tratamiento con CIGB-300.

En conclusión, nuestros resultados aportan nueva información al mecanismo de acción de CIGB-300 y sugieren potenciales usos clínicos para la terapia de pacientes NSCLC.

Abstract

Lung cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer-related deaths worldwide. Up to 80% of cancer patients are classified as non-small-cell lung cancer (NSCLC) and cisplatin remains as the gold standard chemotherapy treatment, despite its limited efficacy due to both intrinsic and acquired resistance.

The CK2 is a Ser/Thr kinase overexpressed in various types of cancer, including lung cancer. CIGB-300 is an antitumour peptide with a novel mechanism of action, since it binds to CK2 substrates thus preventing the enzyme activity. The aim of this work was to analyze the effects of CIGB-300 treatment targeting CK2-dependent signaling pathways in NSCLC cell lines and whether it may help improve current chemotherapy treatment. For this purpose, the human NSCLC cell lines NCI-H125 and NIH-A549 were used.

We demonstrated that CIGB-300 induces an anti-proliferative response both in monolayer and three-dimensional NSCLC models, presenting rapid and complete peptide uptake. This effect was accompanied by the inhibition of the CK2-dependent canonical NF- κ B pathway, evidenced by reduced RelA/p65 nuclear levels and the modulation of NF- κ B protein targets in both lung cancer cell lines, as well as conditionally reduced NF- κ B transcriptional activity. In addition, NF- κ B modulation was associated with enhanced proteasome activity, possibly through the interaction with its α 7/C8 subunit. On the other hand, CIGB-300 was also able to alter the Wnt/ β -catenin pathway, but only when this pathway was previously activated.

Given that NF- κ B activation has been linked to cisplatin-induced resistance, we explored whether CIGB-300 could bring additional therapeutic benefits to the standard cisplatin treatment. We established a resistant cell line that showed higher p65 nuclear levels after cisplatin treatment as compared with the parental cell line. Remarkably, the acquired NF- κ B pathway

Abstract

dependence made the cisplatin-resistant cell line more sensitive to CIGB-300 treatment.

In conclusion, our data provide new insights into CIGB-300 mechanism of action and suggest clinical potential on current NSCLC therapy.

Introducción

El cáncer

En un tejido en el organismo, el crecimiento desregulado de un conjunto de células da lugar a un tumor. La inestabilidad genómica y el estado inflamatorio del ambiente celular circundante son dos características habilitantes que pueden influenciar su formación. En el proceso, las células adquirirán ciertas características que las volverán tumorigénicas y, eventualmente, malignas: la evasión de la apoptosis, la insensibilidad a las señales inhibitorias de la proliferación, la angiogénesis, la capacidad replicativa ininterrumpida, la reprogramación del metabolismo, la evasión del sistema inmune y finalmente la capacidad de invadir localmente y diseminarse originando tumores secundarios en sitios distantes¹. Cuando las células han sido capaces de invadir otros tejidos, estamos en presencia de un tumor maligno, y es lo que se define con el término cáncer.

Las células deben atravesar una serie de procesos biológicos que conducirán al desarrollo de un tumor maligno:

- La acumulación de mutaciones en genes involucrados con la reparación del ADN, en proto-oncogenes y en genes supresores de tumores da lugar al proceso de **transformación**².
- Las células transformadas comienzan su crecimiento. Para ello requieren de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, proceso conocido como **angiogénesis**³. La degradación de la membrana basal permitirá que las células endoteliales puedan penetrar, migrar y proliferar, dando comienzo a la neovascularización.
- Algunas células se pueden desprender de la masa del nuevo tumor debido a la reducción o pérdida de adhesión intercelular. A su vez aumentan su motilidad, permitiendo migrar a través de la membrana basal para alcanzar otras regiones de la matriz extracelular, proceso

denominado **invasión**. Para ello, los componentes de la matriz deben ser digeridos. Las células tumorales son capaces de producir y secretar enzimas degradativas, las proteasas. Además pueden estimular su producción por parte de células adyacentes, inducir la activación de sustratos de proteasas o bien sintetizar factores que activen proteasas ya presentes en el microambiente. Por ejemplo, el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) se encuentra sobreexpresado en el ambiente circundante al tumor y es el encargado de convertir al plasminógeno en la proteasa plasmina. Las proteasas también son capaces de activar mediante el clivaje a factores de crecimiento y citoquinas, teniendo por lo tanto un rol muy importante en la señalización celular⁴.

- En la última etapa, la intravasación y la supervivencia en el torrente circulatorio, seguido del arresto, la extravasación y la proliferación de las células tumorales en un órgano blanco distante dan lugar al desarrollo de la **metástasis**⁵. Esta es la manifestación más notoria del cáncer como enfermedad sistémica, puesto se ha extendido más allá del sitio del tumor primario. Las metástasis son en última instancia la mayor causa de muerte en pacientes con cáncer, ya sea por efectos directos o por las complicaciones aparejadas con su tratamiento.

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tipo de tumor más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo⁶. En nuestro país, con una incidencia de 10.296 casos nuevos por año, abarca al 10% del total de tumores y se ubica entre los cuatro tipos más frecuentes, siendo el que más casos de muerte genera^{7,8} (Figura 1).

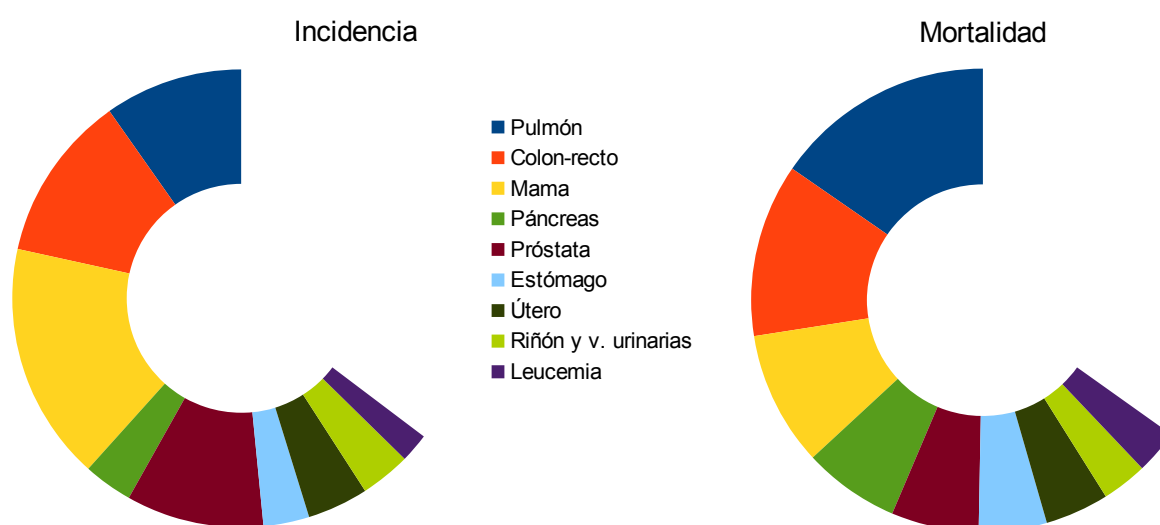


Figura 1: Incidencia y mortalidad de distintos tipos de tumores en Argentina. Elaborado a partir de datos obtenidos del Instituto Nacional del Cáncer (INC) 2016.

Se estima que 4 de cada 5 casos de cáncer de pulmón son causados por el cigarrillo. Para los fumadores (definidos como personas que han consumido más de 100 cigarrillos a lo largo de su vida y actualmente fuma^a), el riesgo de cáncer de pulmón es 10 veces más alto que para los no fumadores. Por esta razón el cáncer de pulmón se considera una enfermedad prevenible. En los individuos no fumadores, los factores de riesgo importantes para el cáncer de pulmón son la exposición al humo de otros fumadores, la exposición a radiación ionizante y la exposición ocupacional a agentes carcinogénicos pulmonares, como el asbesto o el amianto⁹.

a) En Argentina el 30% de la población entre 18 y 65 años fuma. Fuente: Ministerio de Salud.

El cáncer de pulmón se origina a partir de la transformación maligna de células del epitelio pulmonar, tratándose por lo tanto de un carcinoma. Dependiendo de la región en el pulmón donde se origine, tendrá distinciones histopatológicas que darán lugar a su clasificación en dos grandes grupos: el cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (SCLC y NSCLC, de sus siglas en inglés, respectivamente).

Como su nombre lo indica, el SCLC presenta células de menor tamaño que el resto de los carcinomas pulmonares, en las cuales el núcleo ocupa gran parte del espacio subcelular. Suele originarse en el compartimento central, en el bronquio primario o secundario. Al momento del diagnóstico en el 60-70% de los casos la enfermedad ya se encuentra diseminada, por lo cual la cirugía no es una opción para estos pacientes. Si bien suelen responder bien a la quimioterapia, por las razones recién mencionadas el pronóstico es muy pobre, siendo la supervivencia a 5 años de sólo 5-10%

Más del 80-85% de los pacientes pertenecen al grupo de NSCLC, comprendiendo todos los carcinomas pulmonares que no se encuadran en el SCLC. Los dos fenotipos histológicos predominantes son los adenocarcinomas y los carcinomas de células escamosas. En general, los adenocarcinomas se originan en las vías aéreas más distales, mientras que los de células escamosas en las proximales. Los adenocarcinomas presentan una histología glandular y expresan biomarcadores consistentes con su origen distal, tales como el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y queratina 7 (KRT7). En contraste, los carcinomas de células escamosas son más similares al epitelio pseudoestratificado de la tráquea y las vías aéreas superiores. Al momento del diagnóstico se identifican por la inmunopositividad para queratina 5 (KRT5) y queratina 6 (KRT6) y/o los factores de transcripción SRY-box 2 (SOX2) y p63. El último subtipo histológico de NSCLC es el carcinoma de células grandes, que se diagnostica por exclusión en el caso de que el tumor no presente aspecto glandular ni escamoso, y no presente los biomarcadores definidos para

Introducción

los otros 2 subtipos¹⁰. Por último, algunos tumores neuroendocrinos son también clasificados como NSCLC (Figura 2).

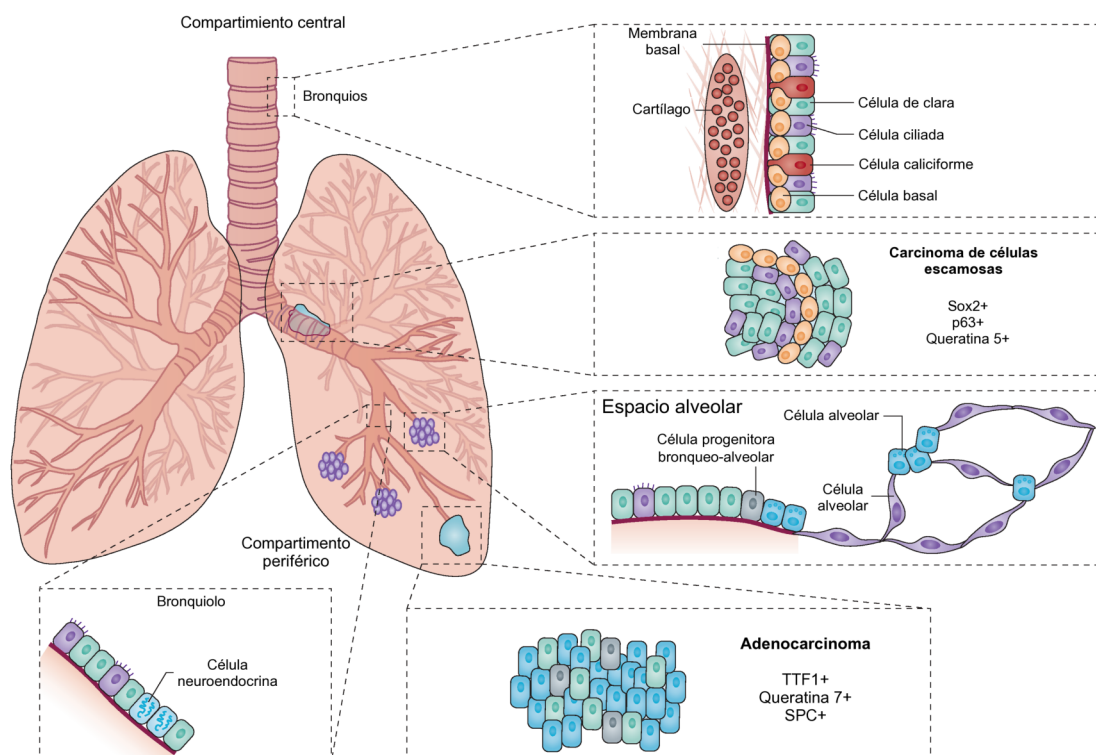


Figura 2: Esquema del pulmón y origen de los principales subtipos de NSCLC. Su función principal es el intercambio gaseoso, mediante el cual el aire inhalado es conducido hacia los alvéolos a través de una red de tubos ramificados. Los de mayor tamaño son los bronquios, ubicados en el compartimento central y cuyas paredes se encuentran revestidas de cartilago. Los más pequeños carentes de tejido cartilaginoso son los bronquiolos. Se ha propuesto que la célula basal de la tráquea es la célula de origen del carcinoma escamoso, el cual suele originarse cerca de un bronquio central. Por el contrario, los adenocarcinomas se originan habitualmente en el espacio alveolar a partir de células progenitoras bronquio-alveolares.

Tratamiento del NSCLC

La resección quirúrgica es la modalidad terapéutica con mayor potencial curativo para esta enfermedad. La radioterapia tiene un rol importante tanto en el tratamiento curativo como paliativo. En pacientes con buen estado general o

pacientes inoperables con enfermedad localizada en el sitio primario (estadíos I a III) puede indicarse radioterapia curativa.

La neoadyuvancia y/o la adyuvancia basada en cisplatino (cis-diaminodicloroplatino(II)) pueden proveer un beneficio adicional a pacientes con estadio II o IIIA, a la vez que la quimioterapia ha producido mejoras en el corto plazo en pacientes con NSCLC avanzado^{11,12}. Sin embargo la resistencia innata y adquirida al cisplatino se ha convertido en uno de los mayores desafíos en el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón, indicando que es imperativo el desarrollo de nuevas drogas con diferentes mecanismos de acción.

A lo largo de los últimos 15 años han sido identificadas diversas mutaciones conductoras (aquellas implicadas de forma causal con oncogénesis) y otras alteraciones genéticas relevantes para el cáncer de pulmón (Figura 3). Este hecho de gran relevancia permitió el desarrollo de la terapia molecular dirigida, la cual no sólo está siendo capaz de mejorar la supervivencia de subgrupos de pacientes que presentan estas alteraciones, sino que además está modificando sustancialmente la forma de tratar al cáncer de pulmón.

Dado que las mutaciones conductoras suelen ser mutuamente excluyentes, se ha desarrollado la idea de que cada paciente con NSCLC, en especial con adenocarcinomas, posee una de estas mutaciones y es un candidato apropiado para ser tratado con un agente específico que la inhiba. Este concepto es conocido como medicina personalizada. Diversos esfuerzos a nivel mundial se están llevando adelante con el fin de integrar la información existente en las bases de datos clínicas sobre mutaciones presentes en los pacientes, como es el caso del Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC) del Instituto Sanger en Reino Unido.

El primer inhibidor de tipo tirosina quinasa (TKI) en ser aprobado para cáncer de pulmón fue el *gefitinib* a comienzos de los 2000s. Este inhibidor es capaz de bloquear al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

conteniendo una mutación sensibilizante. Diversas mutaciones activantes de EGFR son mutaciones conductoras muy frecuentes en los adenocarcinomas pulmonares. Dado que las mutaciones activantes de EGFR raramente ocurrían en tumores que poseían la mutación para el gen KRAS, se comenzaron a buscar otras mutaciones conductoras mutuamente excluyentes en cáncer de pulmón. Así se identificaron las mutaciones conductoras de BRAF, HER2 y las traslocaciones de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), entre otras. El uso de TKI en pacientes positivos para mutaciones en EGFR se ha establecido como primera línea de tratamiento por sobre la quimioterapia. La aparición de nuevas mutaciones en EGFR en pacientes tratados con TKI ha desencadenado la adquisición de resistencia a este tipo de tratamientos, y la consiguiente búsqueda de inhibidores de segunda y tercera generación para estas nuevas mutaciones. Al presente se encuentran aprobados por la FDA^a 4 TKI para EGFR, 3 para ALK y 1 para ROS1¹³. En los años recientes, las plataformas de diagnóstico molecular se han ido incorporando a la evaluación clínica estándar de los pacientes y han sido adoptadas por hospitales y centros oncológicos. Desafortunadamente, los tratamientos crónicos con TKI frecuentemente desencadenan algún tipo de resistencia luego de 9-12 meses.

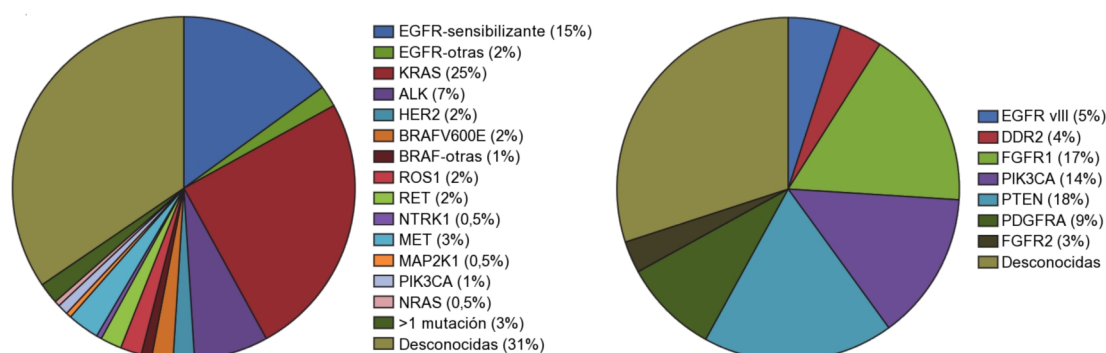


Figura 3: Mutaciones conductoras para adenocarcinomas (izquierda) y carcinomas de células escamosas (derecha). Adaptado de Hirsch et. al (2016)¹²⁷

a) Agencia Federal de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

Otra de las terapias dirigidas que ha cobrado gran relevancia recientemente para cáncer de pulmón es la de anticuerpos bloqueantes de puntos de control inmunológicos, mecanismos que la célula tumoral utiliza para escapar de la respuesta inmune montada por el hospedador. Entre estas moléculas encontramos a la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y a la proteína de muerte celular programada PD-1. CTLA-4 se expresa en los linfocitos T durante su maduración en la fase de cebado y al interactuar con ligandos en las células dendríticas inhibe la activación de la célula T. Análogamente, PD-1 produce señales inhibitorias en el linfocito durante la fase efectora, al interactuar con ligandos PD-L1 presentes en otras células del sistema inmune. Las células tumorales de NSCLC suelen expresar ligandos para ambos tipos de moléculas, valiéndose de este mecanismo inhibitorio para evadir la respuesta inmune. Anticuerpos monoclonales contra PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) han sido recientemente aprobados para el manejo de la enfermedad avanzada en pacientes NSCLC previamente tratados con quimioterapia, donde se ha podido observar una respuesta prolongada al tratamiento, baja toxicidad y efectos del tipo autoinmune controlables clínicamente, con mejoras significativas en la supervivencia global de los pacientes¹⁴. Se ha observado en diversos ensayos clínicos a su vez que la magnitud en la mejora de la supervivencia está relacionada con la expresión de PD-L1 en el tumor, siendo esta más radical en aquellos pacientes con >50% de expresión (sobrevivida global 17,3 meses para pacientes tratados con pembrolizumab vs. 8,3 meses para docetaxel), independientemente de la histología¹⁵. A pesar de alcanzar muy buenos valores de supervivencia global para pacientes con cáncer de pulmón avanzados, no observados hasta el momento con ningún otro tratamiento, el porcentaje de pacientes con alta expresión de PD-L1 que puede verse beneficiado no es muy grande.

Tanto los tratamientos clásicos como las nuevas terapias siguen sin alcanzar una respuesta satisfactoria en la población de pacientes con cáncer de pulmón, dejando de manifiesto la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

Proteína quinasa CK2

Las proteínas quinasas son piezas claves en las vías de señalización dado que pueden tanto promover como reprimir la expresión y la función de enzimas a través de la fosforilación reversible de proteínas blanco¹⁶. La alteración en los niveles o en la actividad de las proteínas quinasas puede conducir a dramáticos efectos sobre el crecimiento celular, la supervivencia y la apoptosis, pudiendo influenciar una gran variedad de enfermedades, entre ellas el cáncer¹.

La proteína quinasa CK2, previamente conocida como Caseína Quinasa 2, fosforila residuos de serina o treonina que poseen dominios ácidos y regula un amplio rango de procesos celulares. Puede utilizar tanto al ATP como al GTP como dador del grupo fosfato. Consiste en un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas diferentes (α y α') y dos regulatorias iguales (β) (Figura 4).

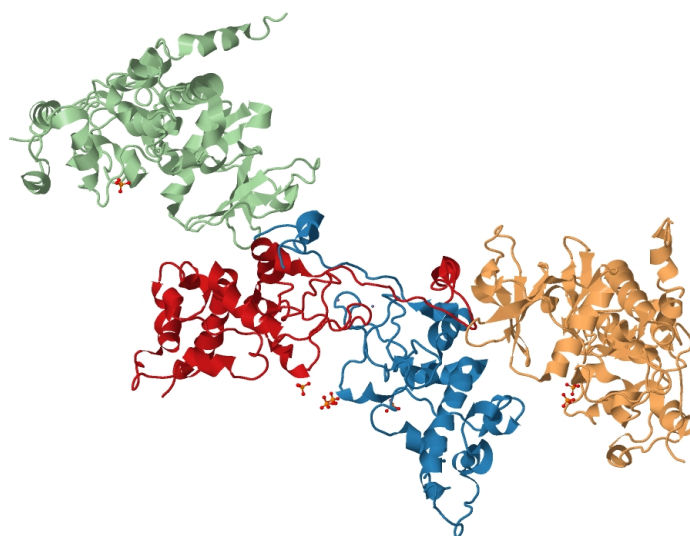


Figura 4: Estructura cristalográfica de la enzima CK2. Diagrama de cintas de la holoenzima. Verde y naranja: subunidades catalíticas α ; rojo y azul: subunidades catalíticas β . Fuente: Protein data bank (pdb.org).

Las subunidades catalíticas son el producto de genes localizados en cromosomas diferentes, aunque poseen un 90% de homología en humanos y su estructura primaria es altamente conservada. Cuando están formando parte de la holoenzima, se ha visto experimentalmente que sólo una de las dos subunidades es activa.

CK2 es probablemente la proteína quinasa con mayor acción pleiotrópica conocida, ya que posee más de 350 sustratos identificados¹⁷. Esta particularidad se puede explicar al menos por dos de sus propiedades: la existencia de una secuencia consenso de fosforilación mínima (S/T-X-X-D/E/pS/pY) y su actividad constitutiva, dado que su función no requiere de ningún cofactor y/o segundos mensajeros. Tampoco es indispensable su previa fosforilación para alcanzar la conformación activa y no se han reportado hasta el momento mutaciones que generen pérdida o ganancia de función. Sin embargo existen otros factores capaces de regular la actividad de la enzima (Figura 5). Entre ellos podemos mencionar la regulación de su expresión y ensamblaje y la fosforilación reversible de sus subunidades, tanto de las regulatorias como de las catalíticas (CK2 posee incluso sitios de autofosforilación en su subunidad β). Además, la interacción con “sustratos regulatorios” tales como las poliaminas o la heparina, puede aumentar o inhibir respectivamente su actividad.

Dentro de las proteínas que interactúan con CK2 y regulan su función podemos encontrar varios tipos, que se pueden clasificar dependiendo de la manera en la que afectan su actividad quinasa. En este sentido, la interacción puede:

- a) ser del tipo enzima-sustrato y producir una regulación competitiva.
- b) afectar directamente la actividad catalítica de CK2, como es el caso de los factores de crecimiento fibroblástico 1 y 2 (FGF-1/2), responsables de aumentar *in vitro* la autofosforilación de la subunidad CK2 β .

- c) afectar indirectamente la actividad de CK2. Existe un grupo de proteínas capaces de funcionar como proteínas adaptadoras o de andamiaje con otras proteínas blanco. Un caso interesante de este tipo de regulación es el de CKIP-1, una proteína localizada en la membrana plasmática, capaz de reclutar a CK2 a esta localización.

Entre los sustratos fosforilados por CK2 podemos hacer distinción entre aquellos fosforilados preferentemente por las subunidades catalíticas libres, la holoenzima o de manera indistinta por uno u otra. Se ha observado por ensayos con péptidos sustrato que la actividad de la holoenzima es mayor a la de las subunidades catalíticas libres. No obstante, esto no restringe la existencia de otros sustratos que requieran, para ser fosforilados, la presencia de las subunidades libres o de las regulatorias¹⁸.

La ubiquidad de CK2 es consecuente con el gran número de sustratos y funciones que cumple en la célula. La enzima se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma, e incluso asociada a estructuras u organelas: el Golgi, el retículo endoplasmático, los ribosomas y, como se mencionó anteriormente, la membrana plasmática¹⁹. Entre sus numerosas funciones podemos destacar su rol en la progresión del ciclo celular. CK2 es requerida para la transición de G1/S y de G2/M. Se la ha encontrado asociada con el huso mitótico y los centrosomas. La fosforilación de sus subunidades también se ha hallado modulada específicamente durante la mitosis, aumentando la afinidad por proteínas regulatorias (como el caso de la MAP quinasa Pin1) y por moléculas claves del ciclo como MAP p38, p34 y la topoisomerasa II. Por último cabe resaltar la importante función que cumple CK2 en la supervivencia y la apoptosis, eventos que serán discutidos a continuación junto con su rol en cáncer.

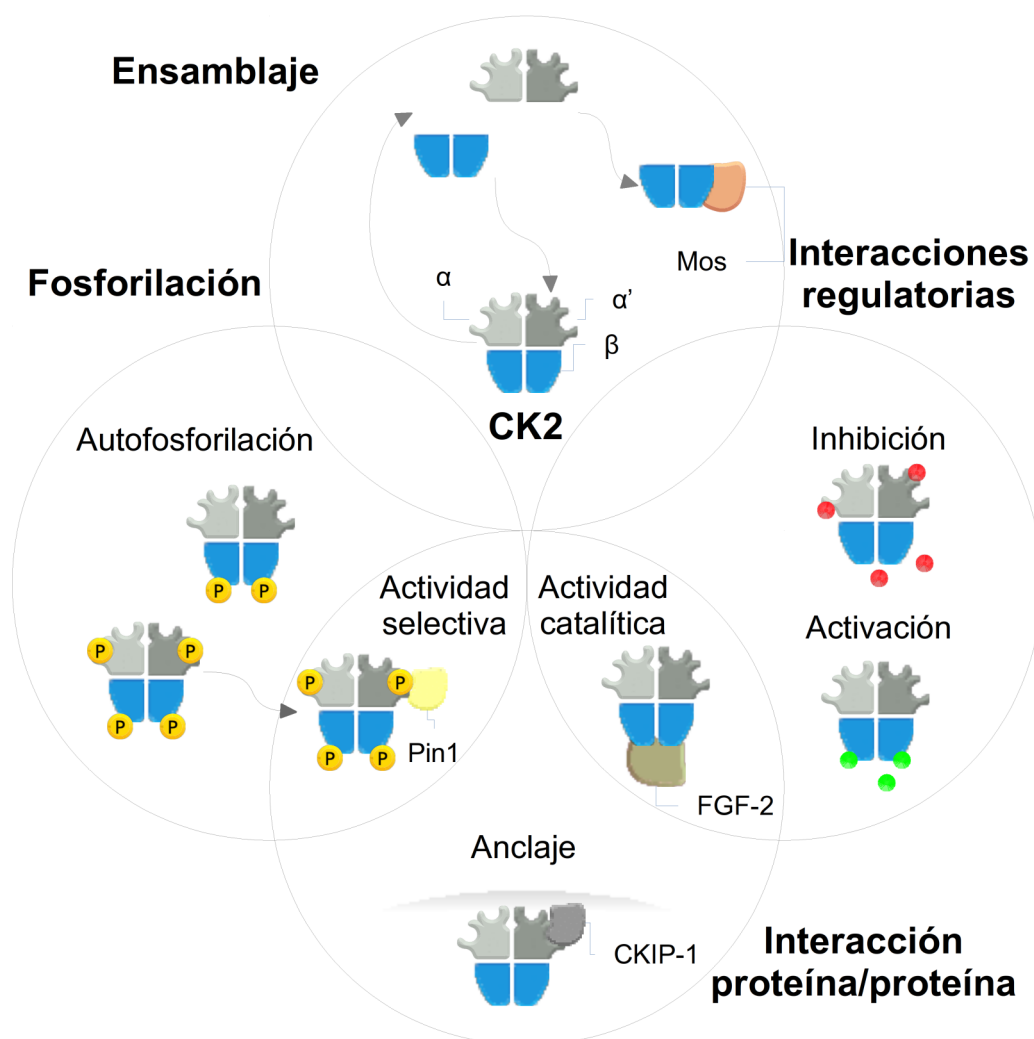


Figura 5: Mecanismos de regulación de la holoenzima CK2. El nivel de expresión, el ensamblado, su fosforilación y la interacción con otras proteínas definen la actividad y la selectividad de la enzima. Las subunidades catalíticas y reguladoras poseen actividad per se, ejemplificado por la interacción de las subunidades β con la proteína del ciclo celular Mos, sobre la que pueden ejercer un efecto inhibitorio. La interacción con ciertas proteínas regulatorias puede depender de la previa fosforilación de la CK2 en sitios específicos, como es el caso con Pin1, quien a su vez determinará la selectividad con nuevos sustratos. Entre otros ejemplos de proteínas regulatorias se encuentran CKIP-1 y FGF-2, descritos en el texto. Otros compuestos polianiónicos (esferas rojas) y policatiónicos (esferas verdes) pueden alterar su actividad. Adaptado de Litchfield¹⁸

El hecho de poseer actividad constitutiva podría hacer pensar que su rol en la biología tumoral es limitado. Sin embargo, numerosos reportes muestran que CK2 se encuentra frecuentemente sobre-expresada en varios tipos de tumores humanos²⁰ (entre los que se incluye al cáncer de pulmón²¹), a la vez que su sobre-expresión puede causar tanto tumores de mama²² como linfomas²³. Varios argumentos apoyan el concepto de que, alcanzado cierto umbral de expresión en la célula, CK2 podría convertirse en un gen conductor del cáncer, generando un ambiente particularmente beneficioso para el desarrollo del fenotipo tumoral. Entre ellos el hecho de que a mayor expresión de CK2, peor es el pronóstico observado en distintos grupos de pacientes con cáncer²⁴. CK2 fosforila varios factores de transcripción, proto-oncoproteínas y supresores tumorales. De hecho, la sobre-expresión de las subunidades catalíticas de CK2 exacerba el fenotipo tumoral²⁵, mientras que el bloqueo de su expresión está asociado con la inducción de apoptosis tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*²⁶. Esto es consecuente con el hecho de que varias proteínas involucradas en vías apoptóticas son sustratos directos de CK2 (por ejemplo el inhibidor de caspasas ARC es fosforilado y activado por la enzima) o están reguladas por su nivel de expresión (tal como la survivina, miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis, aumenta en concomitancia con su expresión). Incluso la secuencia consenso de clivaje de varias caspasas se encuentra en estrecha cercanía con la de fosforilación por CK2¹⁷. Se ha observado que las caspasas fosforiladas en estos sitios son menos propensas a ser clivadas²⁷. A diferencia de otras proteínas quinasas, cuyo rol en la apoptosis puede depender sustancialmente del tipo celular y las condiciones metabólicas, CK2 suele comportarse en la mayoría de los casos como un factor anti-apoptótico y pro-supervivencia.

La implicancia de CK2 en las cascadas de señales es atípica por ser no jerárquica. CK2 está exenta de la regulación vertical efectuada por otras señales debido a su incapacidad de “apagarse” completamente, ejerciendo una regulación lateral sobre estas vías en los diversos niveles que presente proteínas blanco de fosforilación. Es por esta razón que se la ha denominado

un regulador maestro de funciones celulares, comprometido con la integración y la consolidación de mecanismos entrecruzados sobre distintas vías de señalización (Figura 6).

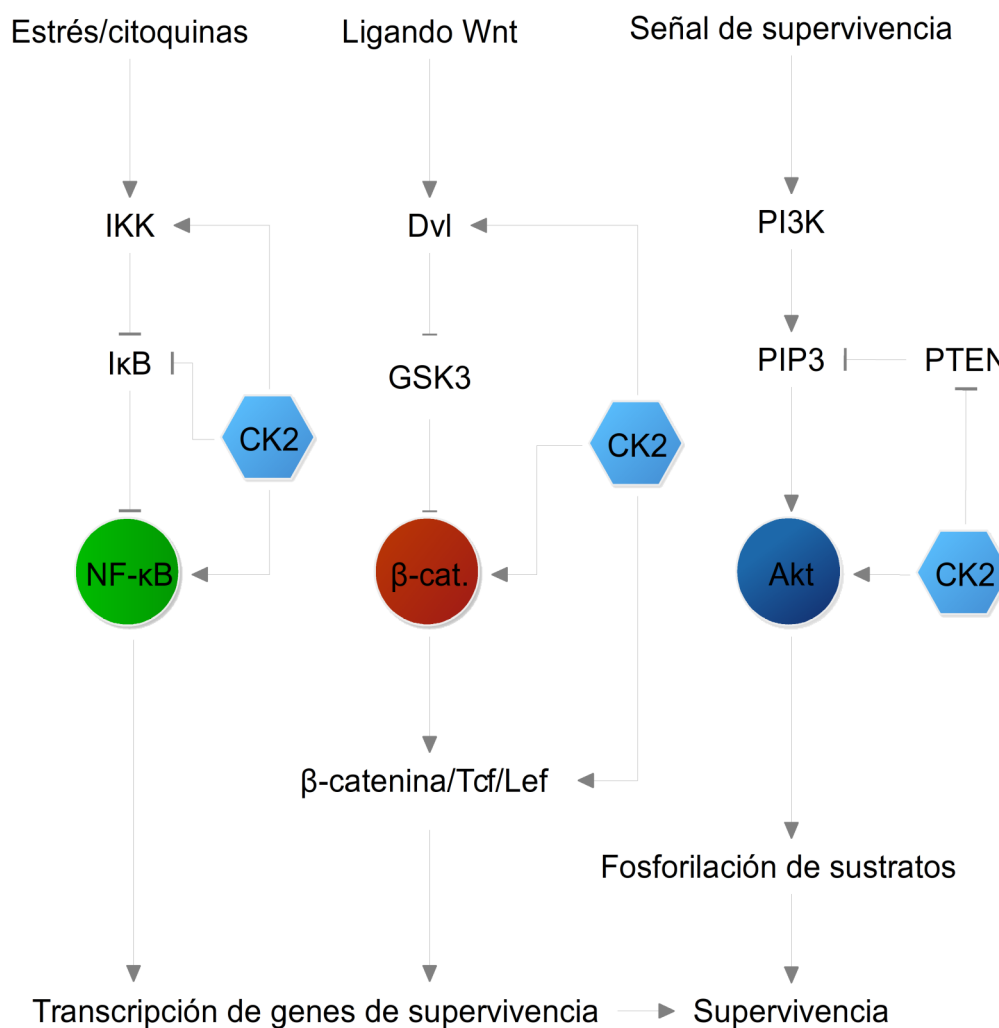


Figura 6: Regulación de CK2 sobre vías de señalización implicadas en la supervivencia celular. CK2 interviene de manera no lineal en tres cascadas de señales determinantes para la supervivencia de la célula: la vía canónica de NF-κB, la vía de Wnt/β-catenina y la de PI3K/Akt. Basado en Ruzzene y Pinna (2010)

Se ha propuesto recientemente que la fosforilación mediada por CK2 podría funcionar como un blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer²⁰. Esto junto con el hecho de que los tumores de NSCLC sobre-expresan CK2,

hacen a esta enfermedad una fuerte candidata para el tratamiento con inhibidores de esta vía.

Diferentes grupos han manipulado las propiedades bioquímicas de CK2 mediante el bloqueo del sitio de unión al ATP, las subunidades catalíticas (α y α') o la regulatoria (β) de la holoenzima, o incluso su expresión génica usando oligonucleótidos antisentido^{28,29}. En el presente trabajo de tesis utilizamos el CIGB-300, un péptido sintético desarrollado siguiendo un enfoque innovador, basado en el bloqueo del sitio fosfoceptor de los sustratos de CK2 en lugar de la enzima *per se*³⁰.

Vías de señalización dependientes de CK2

Eje Wnt/ β -catenina

Los factores de crecimiento Wnt son una gran familia de glicoproteínas secretables, ricas en cisteína. Éstos actúan a través de dos cascadas de señalización principales. La vía canónica de Wnt regula la proliferación, la supervivencia y el destino de la célula, mientras que la vía no canónica está involucrada en la polaridad celular y en la morfogénesis temprana. La vía canónica controla los niveles intracelulares de β -catenina, proteína que de manera independiente de la vía participa de la adhesión celular.

En ausencia de ligandos Wnt, β -catenina es fosforilada en su región N-terminal por CK1 y por la quinasa glucógeno sintetasa 3 β (GSK3 β) dentro de un complejo de destrucción multiproteico, donde APC y Axina actúan como proteínas de andamiaje. Dicha fosforilación marca a β -catenina para su ubiquitinación y posterior degradación por el complejo del proteasoma³¹. Cuando un factor Wnt se une a su receptor, desencadena una cascada de fosforilación que ahora desensambla al complejo de destrucción, estabilizando a β -catenina en el citoplasma (Figura 7).

La vía de Wnt tiene un papel central en el desarrollo del cáncer dado por la modulación de los genes blanco de la molécula β -catenina. Además, la alta frecuencia de mutaciones en genes de esta vía en diferentes tipos de tumores

pone de manifiesto su rol en la carcinogénesis. Se han identificado mutaciones frecuentes en el complejo APC, en factores de transcripción TCF y en los sitios de fosforilación de β -catenina que inducen su degradación³². Respecto al cáncer de pulmón, la activación de la vía de Wnt ha sido asociada con el riesgo de recurrencia en pacientes de NSCLC³³.

La quinasa CK2 es capaz de fosforilar diversas proteínas de la vía de Wnt/ β -catenina, favoreciendo la disrupción del complejo de destrucción y en consecuencia incrementando los niveles citoplasmáticos de β -catenina libre:

- a) Las proteínas de andamiaje Dvl-2 y Dvl-3³¹, al igual que el complejo APC³⁴ se encuentran entre sus blancos de fosforilación.
- b) CK2 también es capaz de asociarse a β -catenina y fosforilarla en el residuo Thr393, incrementando su estabilidad al disminuir su afinidad por la Axina³⁵.
- c) La familia de proteínas de unión al DNA TCF/LEF, que interaccionan en el núcleo con β -catenina, también es fosforilada y estabilizada por la enzima³⁶.

En conjunto estos tres procesos incrementan la actividad de β -catenina como factor de transcripción nuclear y aumentan la expresión de diversas proteínas involucradas en proliferación y resistencia a la apoptosis, tales como C-MYC, Ciclina D1 y Survivina³⁷.

En lo que respecta a CK2 y tumorigénesis, se ha reportado que ratones en los que se sobreexpresó CK2 α en la glándula mamaria, además de desarrollar adenocarcinomas mamarios, los niveles de β -catenina se encontraban elevados³⁸. Por otra parte, la sobreexpresión de CK2 α en células de cáncer de riñón aumentaron los niveles de β -catenina y de los niveles de expresión de survivina, blanco transcripcional de TCF/LEF. Ambos efectos fueron revertidos por el inhibidor de CK2, TBB³⁹.

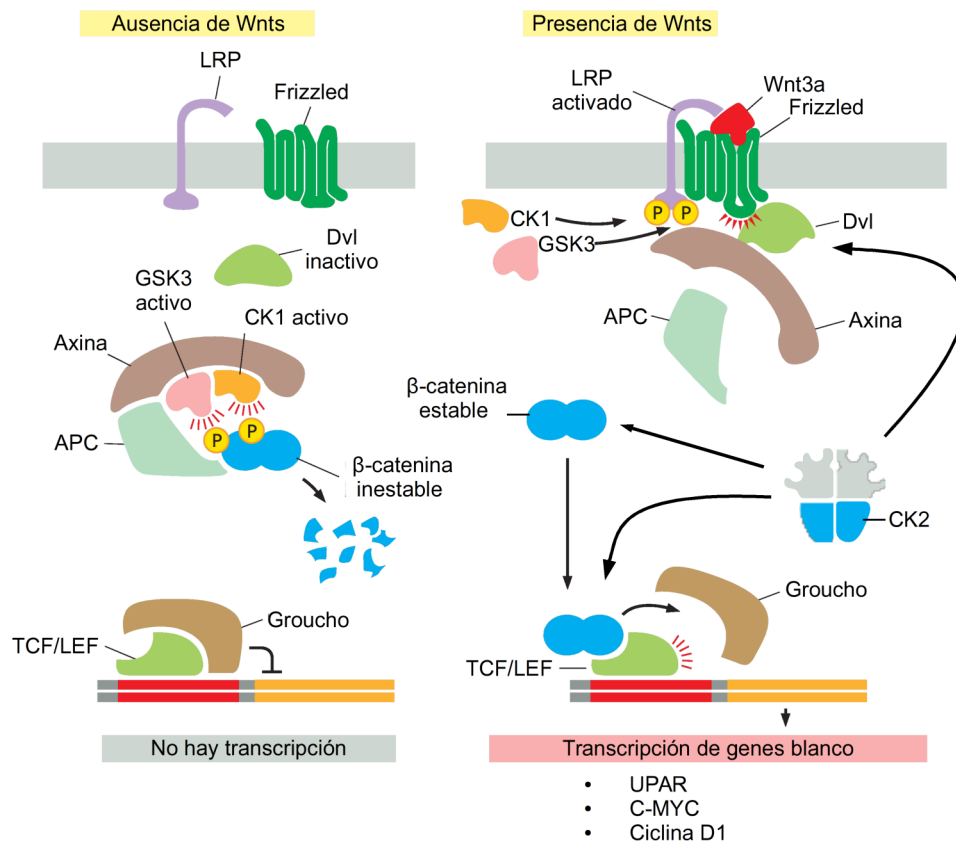


Figura 7: Esquema de la vía Wnt/β-catenina. En ausencia de ligandos Wnt, la β-catenina libre que no está formando parte de las uniones adherentes célula-célula (aquí no mostrada) es secuestrada por el complejo de destrucción y marcada para su degradación, por consecuencia la transcripción de genes blanco se encuentra reprimida. Cuando uno de los 14 factores Wnt se une al receptor Frizzled, el cambio conformacional resultante desencadena una cascada de fosforilación en la cara citoplasmática del co-receptor LRP, que ahora reclutará a las proteínas de andamiaje del complejo de destrucción. La β-catenina no es fosforilada para su degradación y se encuentra estable en el citoplasma, donde su acumulación redundará en la translocación al núcleo. Allí desplazará al co-represor Groucho y se unirá a los factores de transcripción TCF/LEF. Los genes blanco que se transcribirán se encuentran involucrados en supervivencia, adhesión, migración y actividad proteolítica. Se muestran los tres niveles en los que CK2 promueve la activación de la vía: fosforilando a las proteínas de andamiaje y al complejo de destrucción, a β-catenina y a los factores de transcripción TCF/LEF. Adaptado a partir de MBoC 6^{ta} edición, Alberts (2014) y de la bibliografía usada en el texto.

Eje NF- κ B canónico.

La activación de NF- κ B es un evento típico en cáncer debido a su actividad anti-apoptótica y pro-proliferativa⁴⁰. Las proteínas NF- κ B son una familia de factores de transcripción que en condiciones fisiológicas median las respuestas inmunes e inflamatorias. Consta de 5 miembros estructuralmente relacionados que pueden clasificarse en 2 grupos. El primero consiste en p65 (RelA), RelB y c-Rel, los cuales son sintetizados en su forma madura y presentan en el extremo N- terminal el dominio de homología Rel (RHD) y el dominio de trans-activación en el C- terminal (TAD). El segundo grupo está integrado por NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52). Estas proteínas en cambio son sintetizadas como largos precursores (p105 y p100) que luego son procesados en sus formas maduras (p50 y p52). El dominio RHD también está presente en ambas, no así el TAD. Los miembros de esta familia pueden dimerizar en numerosas combinaciones, de las cuales sólo aquellas que contengan a p65, RelB o c-Rel serán factores de transcripción competentes. El heterodímero p65/p50 es el predominante, y será referido en adelante como NF- κ B. Esta molécula se presenta en el citoplasma de manera inactiva y requiere de un estímulo a través de las vías canónica o no canónica para ejercer su rol como factor de transcripción. La activación canónica de NF- κ B requiere de su separación del inhibidor I κ B con el fin de translocar al núcleo y transcribir sus genes blanco⁴¹. La proteína I κ B contiene múltiples dominios repetidos de interacción con el RHD. La pérdida de I κ B ocurre a través de múltiples pasos que incluyen señales de fosforilación, ubiquitinación y finalmente degradación proteasomal. Puede estar gatillada por varios estímulos pro-inflamatorios, entre ellos citoquinas como TNF- α . La propagación de la señal se da por la activación de IKK, quinasa que fosforilará a I κ B, marcándola para su degradación. Posteriormente p65 es fosforilado en la Ser 536 y activado, evento que libera al complejo NF- κ B para su translocación al núcleo. Entre los genes que se transcribirán por su activación se encuentran varios implicados en la progresión maligna, la metástasis y la supervivencia de las células tumorales, entre los que podemos mencionar a Ciclina D1, Ciclina D2,

Ciclina E (proliferación, progresión del ciclo), c-MYC (supervivencia, quimiorresistencia), Bcl-XL, Bcl-2 (inhibidores de la apoptosis) y Bax (pro-apoptótico; regulación negativa)^a.

Diversas quinasas pueden también iniciar esta cascada de degradación y activación, entre ellas CK2⁴² (Figura 8). Los activadores clásicos de NF- κ B inducen la fosforilación en su extremo N-terminal. En cambio, CK2 es considerado como un activador no convencional ya que induce la fosforilación de p65 en la Ser 529. Este evento aumenta su estabilidad y refuerza la activación de la vía, al mismo tiempo que estimula la transcripción del propio p65 por retroalimentación positiva^{43,44}. CK2 también puede fosforilar a I κ B α en su extremo C- terminal (Ser283, Thr291 y Thr299) promoviendo su degradación⁴⁵. Por último la enzima también actúa a otros niveles en la activación de la vía, ya que puede fosforilar a la subunidad β de IKK (Ser32/36), favoreciendo la activación del complejo IKK. CK2 además estimula la expresión de IKK ϵ , otro miembro de esta familia de quinasas⁴⁶. Es interesante remarcar que se ha reportado a NF- κ B como uno de los factores involucrados en el control de la transcripción de CK2 α ⁴⁷.

Existen varios enfoques terapéuticos centrados en la modulación de los niveles de NF- κ B. Entre ellos se destacan los inhibidores de la actividad quinasa de IKK, como es el caso de la sulfasalazina. Se han obtenido buenos resultados de inhibición de la proliferación en modelos *in vitro* e *in vivo* sobre distintos tipos de tumores, asociados a la inhibición de la vía de NF- κ B⁴⁸. También está reportado el beneficio de la sulfasalazina combinada con cisplatino en líneas celulares de SCLC⁴⁹.

a) Los blancos de transcripción fueron obtenidos de <http://www.grnpedia.org/trrust/result.php?gene=rela>. Allí pueden encontrarse las referencias para cada uno de ellos.

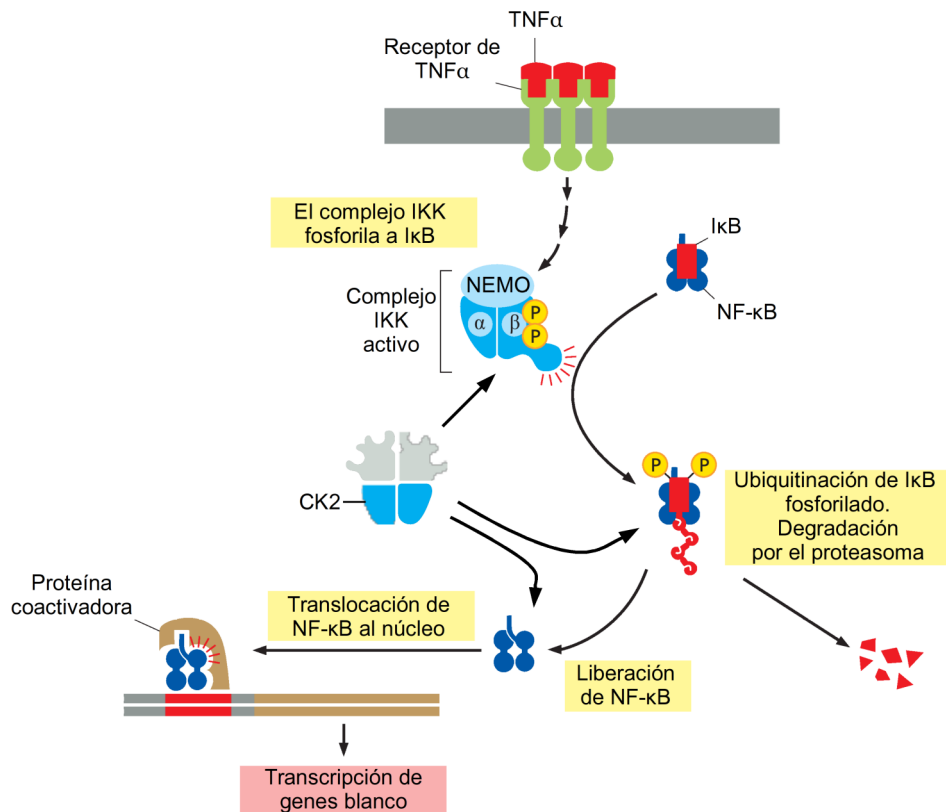


Figura 8: Activación de la vía canónica de NF-κB. Cuando el receptor trimérico de TNFα es estimulado, se genera un rearrreglo conformacional en su porción citosólica, desencadenando una cascada de fosforilación que resultará en la activación de la quinasa de IκB. IKK es un heterotrímero compuesto por dos subunidades (α y β , aunque también puede estar formando parte la ϵ) más NEMO, una proteína reguladora. IκB es luego fosforilada y marcada para su degradación proteasomal, liberando al complejo NF-κB (p65/p50). La translocación subsecuente del complejo al núcleo, en colaboración con proteínas coactivadoras, estimulará la transcripción de genes blanco. CK2 promueve la activación de la vía fosforilando a la subunidad p65 del complejo NF-κB, a IKKβ y a IκBα. Adaptado de MBoC 6^{ta} Ed., Alberts (2014) a partir de la bibliografía usada en el texto.

Es interesante mencionar además el caso del Bortezomib, el inhibidor del proteasoma que se encuentra en la clínica para el tratamiento de mieloma múltiple, y que es capaz de inhibir la proliferación y/o de inducir apoptosis en un gran número de tumores sólidos. Su efecto se ha asociado en parte a su capacidad de bloquear la degradación de IκBα⁵⁰. Sin embargo, inhibidores

específicos de IKK no han podido reproducir todos los efectos asociados al bortezomib. Más aún, el MG-132, otro potente inhibidor del proteasoma, es capaz de inducir apoptosis en células de linfoma Hodgkin sin afectar la activación de NF- κ B. De hecho, un ensayo de fase II en carcinoma de colón no mostró ninguna alteración en los niveles de p65 fosforilado o en la expresión de I κ B sobre las biopsias de pacientes tratados. Llamativamente está reportado en células de mieloma múltiple que bortezomib puede activar NF- κ B⁵¹. Teniendo esto en cuenta, es de esperarse que el efecto del bortezomib sobre la inhibición del proteasoma involucre otros mecanismos que conduzcan a la apoptosis. De hecho, ningún inhibidor “directo” de la vía de NF- κ B ha conseguido llegar a la clínica. Se podría especular que por sí sólo el evento de bloquear esta vía no es lo suficientemente determinante para producir la erradicación de las células tumorales (de hecho en la mayoría de los enfoques se busca la sensibilización a otro tratamiento).

Por último, no hay que perder de vista las reacciones adversas que puede aparejar el bloqueo de NF- κ B en la respuesta inmune, dada la relevancia que tiene este factor de transcripción en los procesos de inflamación.

Como se mencionó anteriormente, la respuesta a cisplatino en pacientes de NSCLC no perdura en el tiempo y conduce a resistencia, lo cual continua siendo uno de los principales desafíos en el tratamiento de esta patología. Se ha reportado que, entre otras moléculas, la activación de NF- κ B se encuentra asociada a la adquisición de resistencia celular inducida por cisplatino^{52,53}. Diversas estrategias terapéuticas han demostrado su eficacia en la sensibilización a la quimioterapia mediante el bloqueo de la señalización dependiente de NF- κ B. Células de NSCLC pre-tratadas con inhibidores de IKK presentaron una mayor respuesta a paclitaxel a causa de bloquear el efecto activador del quimioterápico sobre la vía⁵⁴. En otro trabajo se observó también que gemcitabina inducía la translocación y la unión al DNA de NF- κ B en NSCLC, y que aquellas células que expresaban un I κ B súper-represor

respondían mejor⁵⁵. Sin embargo hasta ahora, la interacción entre CK2, NF- κ B y quimiorresistencia en cáncer de pulmón no ha sido analizada en detalle.

El complejo del proteasoma

Un denominador común de las vías de señalización antes mencionadas es la degradación proteolítica mediada por el proteasoma. La vía proteasomal de degradación de proteínas, tanto dependiente como independiente de ubiquitinación, es la principal encargada de degradar las proteínas intracelulares. El proteasoma 26S es un gran complejo que resulta de la asociación entre la partícula regulatoria 19S y el núcleo proteolítico 20S. El núcleo catálítico es una estructura cilíndrica que consta de cuatro heptámeros en forma de anillos. Los dos anillos más externos están compuestos por subunidades α , mientras los internos por subunidades β . El extremo N- terminal de estas últimas será el responsable del ataque nucleofílico al enlace amida de la proteína blanco. Existen al menos tres tipos de actividades proteolíticas: quimiotripsina, tripsina y caspasa, que dependerán del tipo de sustrato blanco. La habilidad de reconocer y unirse a un sustrato poli-ubiquitinado es conferida por el núcleo 19S. La asociación de ambos complejos con distintas proteínas regulatorias confiere a todo el mecanismo un alto grado de regulación. La especificidad es tal que la degradación de sustratos particulares marcados para degradación puede ser exacerbada sin afectar la proteólisis de otros sustratos. Se observó que CK2 co-purifica con el núcleo 20S del proteasoma⁵⁶ y se ha descrito que es responsable de la fosforilación de la subunidad C8/ α 7^a de este complejo en los residuos Ser243 y Ser250, cercanos a la región C-terminal⁵⁷. Esta subunidad ha sido hallada tanto en el compartimento citoplasmático como en el nuclear.

Cuando la vía de Wnt está inactiva el proteasoma es el encargado de la degradación de la β -catenina inestable en citoplasma, evento que es prevenido por la fosforilación por CK2. Pero por el contrario, CK2 es capaz de fosforilar y promover también el mecanismo de ubiquitinación actuando sobre la enzima

a) Ver http://regphos.mbc.nctu.edu.tw/browse_kinase_detail.php?group=CMGC&family=CK2&subfamily=&kinase=CK2a1#PSMA3

E2 de conjugación de ubiquitina, asistiendo en última instancia a la degradación de la β -catenina y ejerciendo por ende un rol dual de activación e inactivación de la vía. Es posible que la disociación de la holoenzima CK2 en sus subunidades alterne entre una u otra función, dado que se ha observado que mientras el proceso de activación es más dependiente de las subunidades β , el restante está más regido por las subunidades catalíticas α ⁵⁸.

En la señalización por NF- κ B el proteasoma no sólo es responsable de la degradación de I κ B, sino también es esencial para la atenuación de la activación mediante la degradación de los niveles nucleares de p65⁵⁹. Varias subunidades del complejo 19S y del 20S poseen señales de localización nuclear, y se ha visto que se ubican en cuerpos de inclusión nucleares llamados PML, donde se estima que ocurre la degradación de p65 por parte del complejo 26S⁶⁰. Se observó que en células 3T3 I κ B- $\alpha^{-/-}$, la inhibición de la actividad tipo quimiotripsina y tripsina del complejo produjo una acumulación sostenida de p65 nuclear luego de la estimulación por 15min con TNF- α , sin alterar la abundancia en citoplasma. Esta acumulación redundó en una mayor ocupación de los sitios promotores en los genes blanco y un incremento en su transcripción. Estos efectos se mantuvieron en células 3T3 *wild-type* y Hela, donde complementaron el mecanismo de atenuación producido por I κ B- α . Incluso se ha encontrado un mecanismo de regulación de la actividad de p65 dependiente del proteasoma que no requeriría de su ubiquitinación⁶¹.

Entre todas las funciones asociadas a CK2, la modulación de las vías de señalización descritas en el presente capítulo podrían resultar críticas para el desarrollo tumoral. El péptido CIGB-300 resulta entonces una buena herramienta para analizar las funciones biológicas de CK2, al estudiar su mecanismo de acción en cáncer de pulmón.

El péptido CIGB-300

Teniendo en cuenta la relevancia de la enzima CK2 en la tumorigénesis y en la progresión maligna, en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana (Cuba), se ha llevado adelante el desarrollo de un fármaco capaz de regular su función biológica. El enfoque racional se basa en lo conservado del sitio de fosforilación de CK2 en sus más de 300 sustratos, y por ende en su potencial como blanco terapéutico. Mediante la tecnología de *phage display*, se llevó a cabo un *screening* de oligopéptidos capaces de interaccionar con el dominio ácido ($^{28}\text{LND}\text{SSEEEDEI}^{38}$) de uno de los sustratos de CK2, la oncoproteína E7 del virus HPV-16. Al amplio panel de péptidos resultantes se les evaluó su capacidad de interrumpir la fosforilación de este sustrato por CK2 (Figura 9).

El péptido correspondiente al fago 15 (P15) fue seleccionado y fusionado al péptido $\text{TAT}^{48\text{aa}-68\text{aa}}$ del virus HIV-1, confiriéndole así su capacidad de internalización celular (Figura 10).

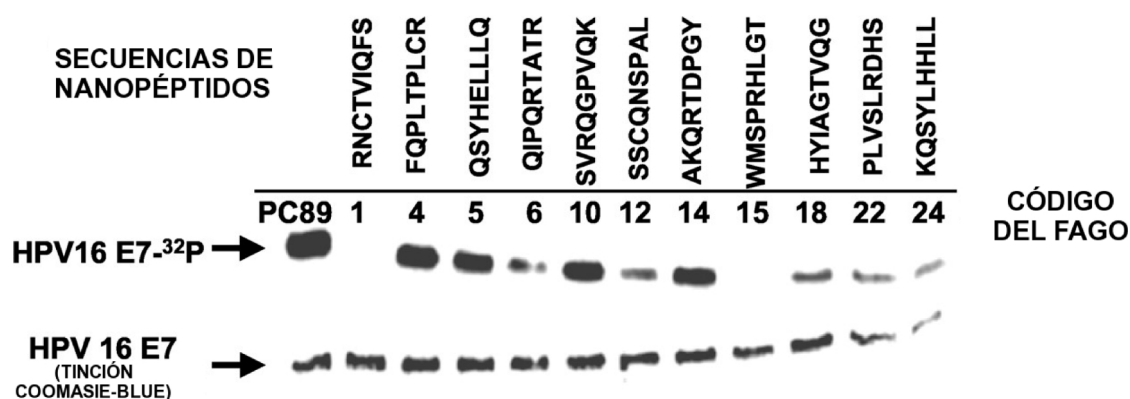


Figura 9: ensayo de inhibición de la actividad quinasa de CK2 por adhesión de un ligando capaz de bloquear la unión a su sustrato (la oncoproteína E7). Se midieron los niveles de ^{32}P presentes en el sustrato frente a los distintos ligandos obtenidos. Los niveles de fosforilación de E7 se relativizan con la fracción de la misma no fosforilada. Los fagos 1 y 15 presentaron altos niveles de inhibición.

El péptido P15-Tat, denominado posteriormente CIGB-300, posee actividad antiproliferativa *in vitro* sobre células transformadas de diferente origen⁶², siendo un fuerte inductor de apoptosis⁶³. CIGB-300 ha demostrado ser eficaz en la reducción de tumores sólidos en modelos con ratones, ya sea a través de la administración sobre el sitio de la lesión, como por vía sistémica. Se ha profundizado ampliamente en el conocimiento acerca de sus blancos moleculares *in vitro* hallándose, entre otras, la interacción con la proteína B23/NPM1⁶⁴, ligando nuclear de CK2 que cumple múltiples roles en crecimiento y proliferación celular, incluida la síntesis y el procesamiento de precursores de ARN ribosomal (rRNA), el ensamblaje y el transporte de ribosomas⁶⁵. Se demostró *in vivo* e *in vitro* que CIGB-300 interacciona en el nucleolo con NPM1 y que es capaz de inhibir la fosforilación mediada por CK2, interrumpiendo la biogénesis de los ribosomas y comprometiendo a la célula a entrar en apoptosis. En el mismo ensayo se observó también que distintos sustratos de CK2 interaccionaban *in vitro* con CIGB-300 en las células NSCLC humanas NCI-H125, entre ellos, la subunidad del proteasoma $\alpha 7/C8$ (PSMA3). Además, se han hallado regulados diferencialmente en células tumorales tratadas con CIGB-300 otros genes asociados con la degradación de proteínas⁶⁶. Entre ellos cabe destacar a PSMB4, proteína asociada recientemente con tumorigénesis⁶⁷.

Por otra parte, estudios *in vitro* de internalización en monocapa demostraron una correlación directa entre la capacidad de ingresar en la célula tumoral y la sensibilidad al tratamiento⁶⁸. El péptido ingresa en cuestión de minutos al interior celular preferentemente por endocitosis mediada por caveolas y es degradado principalmente en lisosomas.

No obstante al amplio conocimiento del mecanismo de acción de CIGB-300, los subsecuentes eventos que llevan a las células tumorales a la muerte no han sido completamente elucidados. Se ha reportado que la inducción de apoptosis es consecuencia del dramático efecto sobre la estructura nucleolar y la resultante liberación de factores pro-apoptóticos. Esta inducción es rápida y ocurre apenas ingresado el péptido en la célula sobre un porcentaje de la

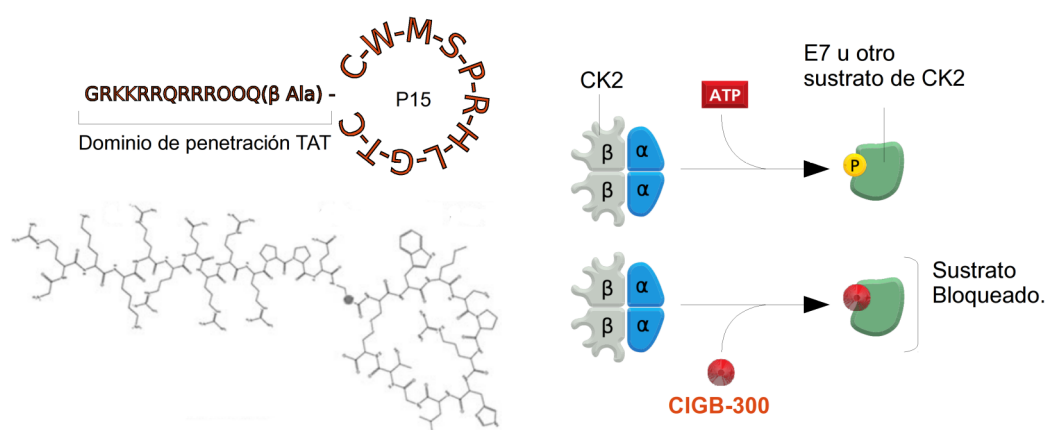


Figura 10: Esquema del péptido CIGB-300. Representación de letras de la secuencia del péptido y de su estructura química (izquierda). El péptido policationico de penetración TAT se encuentra fusionado al dominio inhibidor de la fosforilación, P15, a través de un aminoácido espaciador beta-Alanina. El dominio P15 se encuentra circularizado mediante un puente disulfuro entre sus 2 cisteínas. Posee en su secuencia residuos aminoácidos hidrofóbicos (tales como W, M y L) así también como cargados positivamente (R, H) lo que le confieren una carga neta de +2 a pH fisiológico. Representación del mecanismo de acción de CIGB-300 (derecha).

Respecto a las cascadas de señales alteradas por CIGB-300, se ha visto *in vitro* sobre un modelo de líneas celulares y cultivos primarios derivados de pacientes de leucemia linfocítica crónica que promueve la activación del supresor tumoral PTEN, a la vez que interrumpe las fosforilaciones activantes de Akt en los residuos S129 y S473, como así también la de GSK3 β (S9)⁶⁹. En el presente trabajo de tesis nos proponemos extender el estudio de las vías de señalización dependientes de CK2 moduladas por el tratamiento con CIGB-300 en cáncer de pulmón que no han sido descritas hasta el momento y analizar de qué manera su modulación podría tener un beneficio en su tratamiento.

Los hallazgos mencionados han permitido la utilización de CIGB-300 en protocolos clínicos de fase I/II para el tratamiento de pacientes con cáncer de cuello uterino, donde se ha observado que esta droga es segura y bien tolerada, con buenos resultados preliminares, en relación a su eficacia, cuando se la aplica directamente en las lesiones tumorales⁷⁰⁻⁷². La administración sistémica de 0,2 a 1,6 mg/kg de CIGB-300 se ha probado en una cohorte de 16 pacientes con cáncer avanzado, registrándose efectos adversos de grado 1 y 2, y una mejora en la supervivencia global en 12 de los 16 pacientes (datos no publicados). Cabe destacar que CIGB-300, junto al inhibidor competitivo del bolsillo de ATP/GTP CX-4945 son los únicos dos inhibidores de la función de CK2 que han alcanzado un grado clínico.

Hipótesis

El péptido CIGB-300 afecta in vitro vías de señalización dependientes de CK2 en NSCLC e induce la muerte de células malignas en tumores sólidos. La identificación de éstas vías y la profundización en su mecanismo de acción permitirá desarrollar estrategias que complementen la terapia tradicional. Hipotetizamos que el bloqueo de señales de supervivencia mediado por CIGB-300 puede complementar el efecto de los agentes quimioterápicos que activen estas vías en la célula.

Objetivos

Nuestro objetivo principal es profundizar el conocimiento acerca del mecanismo de acción del péptido CIGB-300 y su efectividad para el tratamiento de tumores sólidos, más precisamente cáncer de pulmón, con el fin de promover su uso en la clínica. Nos proponemos evaluar cuáles vías de señalización están siendo alteradas por el tratamiento, y además analizar si el bloqueo de vías de supervivencia es capaz de sensibilizar a células tumorales resistentes a los agentes quimioterápicos convencionales. Ahondaremos además en los intermediarios de señalización responsables de esta inhibición que son afectados por el tratamiento con CIGB-300 y estudiaremos algunos procesos biológicos que podrían estar siendo alterados.

Para tal fin, nos proponemos los siguientes objetivos particulares.

1. Evaluar el efecto de CIGB-300 sobre distintos aspectos de la progresión maligna en NSCLC, a saber:
 - La viabilidad celular, tanto en cultivos en monocapa 2D como en esferoides 3D, analizando los mecanismos de muerte celular que podrían estar involucrados.
 - La alteración de la motilidad celular y la secreción de enzimas proteolíticas.

2. Estudiar las vías de señalización dependientes de CK2 alteradas por el tratamiento con CIGB-300, puntualmente:
 - Analizar por WB la modulación en los niveles de β -catenina y de p65/NF- κ B a fin de determinar el estado de activación de las vías de Wnt y NF- κ B respectivamente.
 - Profundizar en el estudio de la/s vía/s implicada/s mediante ensayos de inmunofluorescencia y de genes reporteros.
 - Evaluar los intermediarios de señalización que pudiesen estar afectados, tales como proteínas regulatorias y sitios de fosforilación relevantes.
 - Verificar la modulación sobre las proteínas blanco de la/s vía/s.
 - Estudiar otros procesos celulares alterados por el tratamiento que pudiesen estar relacionados con la modulación en la/s vía/s.
3. Analizar el tratamiento con CIGB-300 en un contexto de quimiorresistencia.
 - Evaluar el efecto del quimioterápico cisplatino en las vías previamente descritas.
 - Generar *in vitro* una línea NSCLC resistente a cisplatino.
 - Analizar las vías de señalización alteradas por la adquisición de resistencia en la línea generada.
 - Estudiar la modulación de vías de señalización en la línea quimiorresistente tras el tratamiento con cisplatino y CIGB-300.
 - Determinar el efecto de CIGB-300, solo o en combinación con cisplatino, en la viabilidad de la línea quimiorresistente, con el fin de proponer un nuevo esquema de tratamiento.

Material es y métodos

Síntesis del péptido CIGB-300

El péptido CIGB-300 y su variante conjugada a biotina fueron sintetizadas como lo describe previamente Perea S. y colaboradores.⁷³ Brevemente, los péptidos fueron producidos en fase sólida y purificados mediante cromatografía líquida de alta performance por fase reversa. La secuencia catalítica del péptido fue fusionada al fragmento TAT del virus HIV-1, lo cual le confiere al compuesto la habilidad de atravesar la membrana plasmática^{68,74}. La pureza fue verificada mediante espectrometría de masa.

Reactivos y anticuerpos

Los medios de cultivos fueron obtenidos de Life Technologies Inc. (Rockville, MD). El suero fetal bovino (SFB) de Internegocios (Buenos Aires, Argentina). La acrilamida y demás reactivos para electroforesis fueron comprados a Bio-Rad (Richmond, CA). El Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, de sus siglas en inglés) y el 4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazol (TBB) fueron provistos por Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO). El Factor de Necrosis Tumoral Humano -alfa (TNF α) fue adquirido de ImmunoTools (Friesoythe, Alemania). El bortezomib (VELCADE®) de Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA) y el cisplatino (MARTIAN®) de Laboratorios Kampel (Buenos Aires, Argentina). Los anticuerpos anti-NF- κ B p65 (D14E12 XP®, 1:1000) y Anti-PCNA (#2586, 1:2000) fueron adquiridos de Cell Signaling (Danvers, MA), el anticuerpo anti β -catenina (#610153, 1:1.000) de BD Transduction Laboratories (San Jose, CA), el anticuerpo secundario anti-ratón Horseradish conjugado a peroxidasa (1:5000) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Los anticuerpos anti-conejo (1:5000) y anti- β -actina (1:10.000) de Sigma-Aldrich Co. Los anticuerpos monoclonales anti-GAPDH (sc32233; 1:200 anti-c-MYC (sc-40, 1:100) y anti-Ciclina E (sc-247, 1:200) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Los anticuerpos monoclonales anti-PSMA3 (α 7/C8) (ab109532, 1:100 para inmunofluorescencia, 1:1000 para WB), anti NF- κ B p65

(fosfo- S529) (ab109458, 1:1000) y anti-BAX (ab69643, 1:1000) de Abcam (Cambridge, MA). La Estreptavidina-FITC (SNN1008, 1:300) de Invitrogen-Thermo Fisher (Waltham, MA). Los anticuerpos Anti-conejo hechos en cabra IgG H&L Alexa Fluor® 647 (ab150079, 1:250) e IgG H&L Alexa Fluor® 488 (ab150079, 1:1000) de Abcam. Las membranas Hybond-P para Western Blot y el reactivo de quimioluminiscencia (ECL, de sus siglas en inglés) de Amersham-GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). La Anexina V-Alexa Fluor® 488 y el Ioduro de Propidio de Invitrogen-Thermo Fisher (Waltham, MA).

Líneas celulares y condiciones de cultivos

Se utilizaron dos líneas celulares humanas derivadas de NSCLC: el carcinoma adenoescamoso NCI-H125 (CRL-5801) y el adenocarcinoma NIH-A549 (CCL-185). Para evaluar los efectos de CIGB-300 sobre la progresión se utilizó además la línea murina 3LL (clon de la línea Lewis Lung Carcinoma LCC, CLR-1642) . La línea celular murina L Wnt-3A (CRL-2647) fue utilizada para producir medio condicionado (MC) conteniendo el factor wnt3a, siguiendo las instrucciones de la ATCC. Las líneas A549 y L-Wnt-3A fueron obtenidas de la ATCC. Las líneas 3LL y H125 fueron gentilmente cedidas por el Laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ. La línea H125 se mantuvo en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 80 µg/ml de gentamicina (medio de cultivo completo). Las células A549, 3LL y L Wnt-3A fueron crecidas en medio DMEM, con los suplementos previamente mencionados. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada y con 5% de CO₂.

Tratamientos

Para los estudios de la vía de Wnt, monocapas sub-confluentes de la línea H125 fueron incubadas durante 24h con MC conteniendo el factor wnt3a (dilución 1:1 en medio de cultivo completo) y luego tratadas por otras 6h con una dosis baja de CIGB-300 (IC₂₅) o durante 2h con el inhibidor competitivo de CK2, TBB (25 µM) como control. Para los estudios de NF-κB, las líneas H125, A549 y A549-cispR fueron incubadas por 15 ó 45min con dosis bajas de CIGB-

300 (IC₂₅) en presencia o no de PMA (16nM), TNF α (10ng/ml) o la IC₅₀ de cisplatino (1,0 μ M para H125 y 5,0 μ M para A549). Para el análisis de los niveles proteicos de los genes blancos de NF- κ B, las líneas H125, A549 y A549-Rcisp fueron incubadas por 2h con CIGB-300 (IC₅₀). En el caso del Bortezomib, las células fueron previamente tratadas con 8nM de la droga por 4h.

Determinación de la viabilidad celular

Para medir el efecto de CIGB-300 o del cisplatino en la viabilidad celular, 1x10⁴ células/pocillo fueron sembradas en placas de 96 pocillos en condiciones de cultivo estándar. Luego de 24h las células fueron tratados con diferentes dosis de CIGB-300 (de 25 a 400 μ M) o cisplatino (de 0,3 a 30 μ M) durante 72h. La proliferación celular fue evaluada luego de 72h mediante el ensayo de MTS (Celltiter 96TM, Ensayo de Proliferación No Radiactivo, Promega), como describe el fabricante. Los datos fueron analizados usando el paquete “iC₅₀”⁷⁵ del software R, con el fin de determinar los valores de IC₅₀ para cada droga, en el cual el ajuste de la curva a los datos se realiza mediante regresión no lineal. El efecto sobre el potencial proliferativo también se determinó mediante recuento celular directo. Brevemente, las células fueron sembradas por duplicado en placas de Petri de 35mm, tratadas por 72h y finalmente lavadas dos veces con PBS, tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en el volumen adecuado para finalmente ser contadas en un hemocitómetro usando azul de tripán como criterio de exclusión.

Ensayo de apoptosis

La capacidad de CIGB-300 de inducir muerte celular y sus mecanismos subyacentes se estudió mediante tinción con Annexina V y microscopía de epifluorescencia en la línea H125. Monocapas subconfluentes fueron tratadas o no con la IC₅₀ de CIGB-300 durante 1h o con Etopósido 10 μ M por 24h. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS y levantadas con tripsina-EDTA. Luego, 1x10⁵ células de cada tratamiento se resuspendieron en 100ul de *Binding Buffer* (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂, pH 7,4), a los que

se les añadió 5ul de Annexina V. La tinción de Ioduro de Propidio (1,5mM) fue utilizada como indicador de muerte. Ambos reactivos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 300xg por 5 minutos a 4 °C. Los *pellets* se resuspendieron en 200ul de *Binding Buffer*. Finalmente se colocaron en un portaobjeto utilizando *Cytospin*, se montaron con Vectashield conteniendo DAPI y se observaron al microscopio de epifluorescencia. Se fotografiaron 5 campos de cada tratamiento. Las células con marcación verde en la membrana plasmática fueron contabilizadas como apoptóticas. Aquellas que además presentaban marca naranja (del Ioduro de Propidio) fueron consideradas necróticas/apoptóticas tardías. Los porcentajes de cada tipo se relativizaron al número de células totales.

Alternativamente, para evaluar el mecanismo de muerte en las células A549 y A549-cispR, ambas líneas creciendo en cubreobjetos fueron tratadas con 300µM de CIGB-300 durante 18h y luego teñidas con Naranja de Acridina (10µg/ml) y Bromuro de Etidio (10µg/ml). La visualización se realizó en un microscopio de epifluorescencia Eclipse E400, Nikon. Se fotografiaron 10 a 15 campos por condición. Los núcleos verdes con estructura organizada se consideraron células vivas. Núcleos verdes muy brillantes o núcleos naranjas a rojo fueron clasificados como apoptosis temprana o tardía respectivamente. Núcleos teñidos uniformemente de color naranja a rojo, con estructura organizada, al igual que citoplasmas naranjas a rojos, se consideraron células necróticas (Figura 1). El porcentaje de células muertas con respecto al número total fue determinado para cada línea celular.

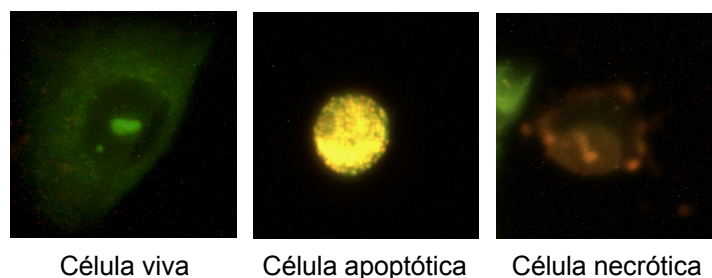


Figura 1: Tinción por Naranja de Acridina / Bromuro de Etidio. Ejemplos.

Secreción de enzimas proteolíticas

Para preparar los MC las monocapas fueron lavadas durante 30min con PBS y se incubaron en medio libre de SFB durante 24h en presencia o no de dosis bajas de CIGB-300. Tras recuperar el sobrenadante (MC) las células fueron lisadas y el contenido proteico cuantificado por el método de Bradford.

La secreción de uPA se analizó mediante caseinólisis radial utilizando geles de agarosa-caseína ricos en plasminógeno (2g/ml). Los geles se incubaron 24h en cámara húmeda y se midió el diámetro de los halos de degradación producidos por la actividad enzimática sobre la caseína. Los valores de uPA de los MC se refirieron a una curva estándar de uroquinasa purificada y se expresaron como UI/mg de proteína celular/24h.

Para cuantificar la actividad de la MMP-2, los MC se analizaron mediante zimografía, utilizando geles de poliacrilamida al 7% co-polimerizados con gelatina. Luego de la corrida electroforética, los geles se incubaron a 37°C por 72h en un *buffer* que permite el desarrollo de la actividad gelatinolítica (NaCl 0,15M, CaCl₂ 10mM y 50mM Tris-Hcl pH 7,4). Los zimogramas se tiñieron con Coomassie Blue (0,1% Coomassie R-250, 10% ácido acético y 30% metanol) y la actividad proteolítica se reveló como bandas claras de degradación sobre un fondo oscuro. Las bandas se cuantificaron por densitometría empleando el sistema Foto/Analyst Express System (Fotodyne) y el software ImageJ. Los datos se expresaron en unidades arbitrarias y fueron normalizados en relación a su concentración proteica. Para la detección de actividad gelatinolítica inespecífica, los geles se incubaron en la misma solución *buffer* suplementada con 40mM EDTA. Después de la incubación, los geles se fijaron y se tiñeron con Coomassie Blue.

Cultivos 3D y ensayos de internalización del péptido

Los esferoides de células tumorales se obtuvieron mediante la técnica de gota pendiente⁷⁶. Brevemente, una gota de 20ul de medio de cultivo completo y filtrado conteniendo el número inicial de células que formará cada esferoide (250 a 2000) se coloca sobre la tapa de una placa de 48 pocillos y se la deja

incubando en la estufa, “pendiendo” de la misma. Sobre cada pocillo se deja preparado un *coating* de agar al 1,5% m/v con 500ul de medio completo. Para el ensayo de inhibición del crecimiento en 3D, cada “gota” conteniendo un único esferoide de 1000 células iniciales fue colocada en 500ul de medio de cultivo completo en placas de 48 pocillos 3 días después de su formación. Luego de 2 días los esferoides fueron tratados o no con diferentes dosis de CIGB-300 (IC_{25} e IC_{50} obtenidas de los cultivos en monocapa). Cada 48h se reemplazaron 250ul del medio de cultivo completo, suplementado o no con CIGB-300 (2 veces más concentrado). Al mismo tiempo, se registraron imágenes usando un microscopio óptico de contraste de fase. El área, la circularidad y la redondez de los esferoides fueron medidas usando un macro personalizado del ImageJ (Anexo, Macro 1), y finalmente el volumen fue calculado. Para los ensayos de cinética de internalización, esferoides de 2 días fueron tratados con una variante biotinilada de CIGB-300 de 5 a 60min. Los esferoides fueron fijados en formaldehído (4% en PBS) por 30min y embebidos en parafina. Secciones de 5μM se obtuvieron usando un micrótopo sobre vidrios revestidos con polilisina. Finalmente, se realizó una inmunocitoquímica por el método de Estreptoavidina-biotina con el kit de VECTASTAIN Elite ABC de los Laboratorios Vector (Burlingame, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como colorante de contraste se utilizó hematoxilina de Mayer. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio óptico de campo claro a 400X de aumento. Para el análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ. La tinción inmunorreactiva fue cuantificada transformando cada imagen a coordenadas polares, de manera de poder medirla en función de la distancia al centro del esferoide. Usando la herramienta de detección de color, del plugin Immunohistochemistry Image Analysis Toolbox⁷⁷, se graficó el perfil de intensidad (valor de grises en función de la distancia) para cada imagen.

Ensayo de migración

La capacidad migratoria se evaluó mediante el ensayo de “cicatrización de heridas”. Sobre monocapas confluentes de células 3LL y H125 se realizó

una “herida” utilizando la punta de un *tip* amarillo. Las heridas fueron fotografiadas mediante microscopía de contraste de fase. Posteriormente las monocapas fueron tratadas o no durante 20h (3LL) o 7h (H125) con distintas dosis de CIGB-300 y los mismos campos fueron fotografiados nuevamente. El área cubierta por las células migrantes se evaluó cuantificando el área libre de células en la herida original $\text{Área}(t_0)$ frente al área libre de células luego del ensayo $\text{Área}(t_f)$ para cada condición. La cuantificación se llevó a cabo usando un macro personalizado del ImageJ (Anexo, Macro 1). La capacidad migratoria fue expresada como velocidad media de cada frente de migración utilizando la

siguiente ecuación: $|\vec{v}_m| = \frac{\text{Área}(t_0) - \text{Área}(t_f)}{2 \times h \times t}$ (Ecuación 1), donde h es la altura de la “herida”, t es el tiempo total de migración y $\frac{1}{2}$ es la contribución de cada frente.

Separación de las fracciones nucleares y citoplasmáticas

Con el fin de determinar los niveles de β -catenina, las proteínas citoplasmáticas fueron extraídas usando el buffer de lisis Saponina. Para ello, monocapas subconfluentes fueron incubadas durante 20min en hielo con el buffer de lisis Saponina (Hepes 25mM, Acetato de Potasio 75mM y 0,1% saponina, más inhibidores de proteasas y fosfatasas). El extracto se recolectó, el procedimiento se repitió una vez más y se juntaron y centrifugaron ambos extractos.

Para la detección de NF- κ B, las proteínas nucleares y citoplasmáticas fueron separadas por centrifugación diferencial siguiendo el protocolo de Abcam. Monocapas subconfluentes fueron lavadas dos veces con PBS frío y colectadas con 250 μ l de buffer de Fraccionamiento (HEPES 20mM, KCl 10mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 1mM y 2-Mercaptoetanol 1M, más inhibidores de proteasas y fosfatasas), usando un *scraper* de teflón. Las suspensiones celulares fueron pasadas 10 veces a través de una aguja de 25 gauge e incubadas en hielo por 20min. Luego las muestras se centrifugaron 5min a 700xg. Los *pellets*, que contenían las proteínas de la fracción nuclear, se lavaron repitiendo el

procedimiento anterior, para finalmente ser resuspendidos en buffer Nuclear (buffer de Fraccionamiento más glicerol 10% y SDS 0,1%). El sobrenadante fue centrifugado 5min a 10.000xg y se colectó la fracción soluble, que contenía la fracción citoplasmática y de membrana.

Como control de pureza, se evaluaron los niveles nucleares de la proteína citoplasmática GAPDH (Figura 2A). Se detectaron niveles nucleares de GAPDH muy por debajo de los citoplásmaticos. Por el contrario se verificó la presencia de Actina en el núcleo^{78,79}, la cual también fue inferior a la citoplasmática. Dado que, tanto los niveles de Actina nuclear como los de PCNA (marcador usualmente utilizado para el control de carga nuclear) permanecieron inalterados luego del tratamiento por 24h con CIGB-300, se decidió utilizar a la Actina como control de carga nuclear (Figura 2B).

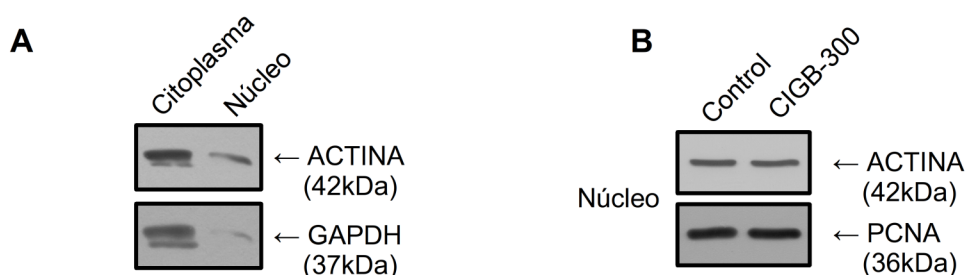


Figura 2: Controles de pureza y de carga nuclear. Panel A: Extractos citoplasmáticos y nucleares de células A549 se analizaron por Western blot para Actina y GAPDH. Panel B: Extractos nucleares de células A549 tratadas o no por 24h con CIGB-300 se analizaron por Western blot para Actina y PCNA.

Western Blot (WB)

Monocapas subconfluentes fueron lavadas dos veces con PBS frío y luego lisadas en frío con buffer RIPA (NaCl 150 mM, 1 % de NP-40, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, 0.5 % deoxicolato, más inhibidores de proteasas y fosfatasas). Luego de la cuantificación proteica, las muestras se corrieron en geles de 10% de SDS-PAGE, que fueron transferidos a membranas Hybond-P. Las membranas se bloquearon por 1h en leche descremada al 5% en TBS

0,1% Tween-20. Las membranas fueron luego incubadas por 1h con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche (ON, de sus siglas en inglés), y con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa Horseradish durante 1h a temperatura ambiente (TA). La detección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia. Las placas fueron digitalizadas usando el sistema Photo/Analyst Express (Fotodyne Inc. Hartland, WI).

Ensayo de genes reporteros

Células H125 fueron co-transfectadas transitoriamente con el Vector Reportero de Luciferasa Firefly NF- κ B-RE-luc (pGL4.32) y el Vector reportero Control de Luciferasa Renilla (pRL-TK) (Promega, Madison, WI) en una proporción 10:1, usando Eugene (Promega). Se sembraron 1×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos, las cuales fueron transfectadas al día siguiente. Seis horas después de agregados los reactivos de transfección, las células fueron lavadas y cultivadas en medio completo. Luego de una recuperación ON, las células fueron tratadas durante 6h con PMA (16nM), en presencia o no de CIGB-300 (IC₂₅) durante la primer hora. Finalmente las células fueron lisadas y las actividades de luciferasa determinadas usando el Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). La actividad luciferasa de NF- κ B-RE se normalizó a la actividad luciferasa constitutiva de Renilla.

Microscopía de fluorescencia

Células H125 creciendo sobre cubreobjetos fueron tratadas con CIGB-300 (IC₂₅) durante 15min en presencia o no de PMA (16nM), lavadas dos veces con PBS, fijadas en frío con paraformaldehído, permeabilizadas en frío con PBS-Tritón 0,1% y bloqueadas en PBS conteniendo 5% de BSA durante 1h a TA. La proteína p65 fue detectada por incubación con anticuerpo primario específico diluido en solución de bloqueo, seguida por la incubación durante 1h a TA con anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Se realizaron controles de inespecificidad incubando únicamente con el anticuerpo secundario, que no presentaron señal visible. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de epifluorescencia Eclipse TE2000

Nikon y se procesaron y analizaron usando el software ImageJ. La intensidad de señal nuclear fue medida tomando como área nuclear el solapamiento con DAPI. El número de núcleos positivos fue contabilizado y expresado como porcentaje del número total para cada condición. El número total de núcleos se determinó mediante un macro personalizado del ImageJ (Anexo, Macro 2).

Generación de la línea celular resistente al cisplatino

La línea celular A549 resistente a cisplatino (A549-cispR) fue obtenida mediante la administración crónica de la IC_{50} (5,0 μ M) de cisplatino a lo largo de 6 meses, según se describió previamente⁸⁰. La línea A549 parental fue mantenida en paralelo en cultivo durante el mismo período de tiempo.

Ensayo de interacción de drogas

Para determinar el índice de combinación (CI, de sus siglas en inglés) de CIGB-300 y cisplatino, las líneas A549 y A549-cispR fueron tratadas con ambas drogas siguiendo un esquema de proporciones constantes, adicionando 1 parte de cisplatino cada 40 de CIGB-300 en cada mezcla. Por ejemplo, para el punto de combinación formado por la IC_{50} de cada droga se adicionaron 7,68 μ M de cisplatino y 307 μ M de CIGB-300. Cada mezcla fue un múltiplo de la IC_{50} para cada droga, utilizando 3 puntos por encima y 2 por debajo de las IC_{50} . Los tratamientos se adicionaron a las células sembradas en placas de 96 pocillos por 72h. Las células se trataron también con cada droga por separado. Las drogas y el medio fueron reemplazados cada 24h. Los tratamientos, hechos por triplicado, se detallan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Esquema experimental con las combinaciones empleadas.

		0,64x IC ₅₀ CIGB-300 (197µM)	0,80x IC ₅₀ CIGB-300 (246µM)	1x IC₅₀ CIGB-300 (307µM)	1,25x IC ₅₀ CIGB-300 (384µM)	1,56x IC ₅₀ CIGB-300 (480µM)	1,96x IC ₅₀ CIGB-300 (600µM)
0,64x IC ₅₀ Cisplatino (4,92µM)		0,64x (IC ₅₀ cisp +IC ₅₀ CIGB)					
0,80x IC ₅₀ Cisplatino (6,14µM)			0,80x (IC ₅₀ cisp +IC ₅₀ CIGB)				
1x IC₅₀ Cisplatino (7,68µM)				1x (IC ₅₀ cisp +IC ₅₀ CIGB)			
1,25x IC ₅₀ Cisplatino (9,60µM)					1,25x (IC ₅₀ cisp +IC ₅₀ CIGB)		
1,56x IC ₅₀ Cisplatino (12,0µM)						1,56x (IC ₅₀ cisp +IC ₅₀ CIGB)	
1,96x IC ₅₀ Cisplatino (15,0µM)							1,96x (IC ₅₀ cisp +IC ₅₀ CIGB)

Los efectos de todos los puntos se representaron como CI vs. Fa, donde Fa es la fracción afectada y representa el nivel de inhibición de la proliferación respecto de la condición sin tratar (por ejemplo, un Fa de 0,6 corresponde a una inhibición en la proliferación del 60%). Los valores de CI se obtuvieron a partir de tres experimentos diferentes usando el Software Compusyn⁸¹.

Apoyado en la ley de acción de masas, y mediante deducciones matemáticas, el teorema de Chou y Talalay llega a la curva de efecto medio, una ecuación general que describe la relación dosis-efecto de una droga dada:

$$\frac{Fa}{Fu} = \left(\frac{D}{Dm} \right)^m \quad (\text{Ecuación 2}), \text{ que calcula para cada dosis } D \text{ la fracción afectada}$$

Fa correspondiente (Fu es la fracción no afectada), donde Dm es la dosis de efecto medio (es decir la IC₅₀) y m el coeficiente que describe la forma de la curva, siendo m=1, >1 ó <1 una curva hiperbólica, sigmoidea y sigmoidea plana

respectivamente. La conformidad de los datos empíricos con la ley de acción de masas y la curva de efecto medio puede estimarse a partir del coeficiente de correlación lineal r . Cuando $r=1$ la conformidad es perfecta, mientras que $r>0,95$ se considera como un ajuste satisfactorio para ensayos *in vitro*.

La ecuación de efecto medio para una sola droga puede ser extendida a múltiples drogas. Para el caso de la combinación de dos drogas, obtendríamos

la Ecuación 3:
$$\frac{(Fa)_{1,2}}{(Fu)_{1,2}} = \frac{(Fa)_1}{(Fu)_1} + \frac{(Fa)_2}{(Fu)_2} = \left(\frac{D_1}{Dm_1} + \frac{D_2}{Dm_2} \right)^m$$

Cuando dos drogas son combinadas mediante diluciones seriadas y constantes (lo que se llama un esquema de proporciones constantes y que es el utilizado en este ensayo), la nueva mezcla obtenida “se comporta” como una tercera droga hipotética con su propia curva de efecto medio, y por ende sus propios valores de Fa para cada valor de D ensayado.

Basados en la ecuación de efecto medio para dos drogas (Ecuación 3), Chou y Talalay introducen el término índice de combinación (CI) que definen

como:
$$CI(Fa) = \frac{(D)_1}{(D_{Fa})_1} + \frac{(D)_2}{(D_{Fa})_2}$$
 (Ecuación 4), y permite calcular el CI para

cada Fa obtenido de la curva para las mezclas de drogas. En el denominador, $(D_{Fa})_1$ es la dosis necesaria de la droga 1 para producir el efecto Fa , al igual que $(D_{Fa})_2$ es la dosis necesaria de la droga 2 para producir el mismo efecto Fa . Los valores de $(D_{Fa})_1$ y de $(D_{Fa})_2$ pueden ser calculados a partir de la Ecuación 2. En el numerador, $(D)_1 + (D)_2$ “en combinación” producen también el mismo efecto Fa , es decir que son el aporte de cada droga en la mezcla. La suma de estas dos fracciones darán cuenta de cómo es el aporte de cada droga en el efecto (Fa) por separado, respecto de su contribución en la mezcla. En la tabla siguiente se detalla la interpretación cualitativa del rango de valores de CI.

Tabla 2: Descripción de valores de CI posibles.

Rango de CI	Descripción
<0,1	Sinergismo muy fuerte
0,1 – 0,3	Sinergismo fuerte
0,3 – 0,7	Sinergismo
0,7 – 0,85	Sinergismo moderado
0,85 – 0,90	Sinergismo suave
0,90 – 1,10	Cercano a aditivo
1,10 – 1,20	Antagonismo suave
1,20 – 1,45	Antagonismo moderado
1,45 – 3,3	Antagonismo
3,3 - 10	Antagonismo fuerte
>10	Antagonismo muy fuerte

Determinación de la actividad del proteasoma

La actividad del proteasoma fue medida en la línea H125 mediante el ensayo Proteasome-Glo Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células H125 se sembraron en placas de 96 pocillos y 24h después fueron tratadas con CIGB-300 (30min) o Bortezomib (4h). Se adicionaron 100ul del reactivo Proteasome-Glo™ Cell-Based Reagent a cada 100ul de muestra y se incubó a TA por 10min. La emisión de luminiscencia fue medida con un luminómetro Multimode Microplate Reader, Synergy (Biotek).

Inmunofluorescencia confocal

Células H125 creciendo sobre cubreobjetos fueron tratadas con CIGB-300 conjugado a biotina por 30min, lavadas dos veces con PBS, fijadas con paraformaldehído frío, permeabilizadas con PBS-Tritón 0,1% por 10min en frío y bloqueadas con PBS conteniendo 5% BSA por 1h a TA. La proteína $\alpha 7/C8$ fue detectada por incubación con un anticuerpo monoclonal primario específico diluido en PBS con 5% de BSA, seguido por la incubación durante 1h a TA del anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 647 y del conjugado Estreptoavidina-FITC. El anticuerpo primario presentó una única banda en ensayos de WB (Figura 3). Se realizaron controles de inespecificidad, incubando únicamente con el anticuerpo secundario y el conjugado Estreptoavidina-FITC que no presentaron señal visible. Los núcleos fueron

visualizados con DAPI. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal LSM 510 Meta (Zeiss).

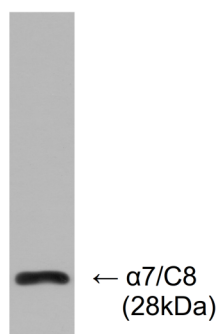


Figura 3: Control de especificidad de anticuerpo primario. Extractos totales preparados a partir de células H125 se analizaron por Western blot para PSMA3 (α7/C8).

Las imágenes confocales fueron procesadas mediante el software ImageJ. El ruido de fondo de cada canal fue sustraído. Los coeficientes de Pearson y Manders fueron calculados usando el plugin JACoP⁸². El análisis de célula única para 15 a 20 células representativas fue realizado en tres experimentos independientes. Se representó además un mapa de colocación para una célula y un gráfico de puntos, en el cual la intensidad de un color es representada en función de la intensidad del segundo color para cada pixel.

El coeficiente de correlación de Pearson (PCC) es un valor entre -1 y 1 que se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$PCC = \frac{\sum_p (R_p - \bar{R}) \times (V_p - \bar{V})}{\sqrt{\sum_p (R_p - \bar{R})^2 \times \sum_p (V_p - \bar{V})^2}} \quad (\text{Ecuación 5}), \text{ donde } R_p \text{ y } V_p \text{ son los}$$

valores de intensidad de los canales rojo y verde, respectivamente, del pixel p , y $\bar{R}$ y $\bar{V}$ el promedio de intensidad de rojo y verde, respectivamente, de toda la imagen. Para cada pixel, la ecuación representa cuán similares u opuestas son las intensidades de rojo con respecto al verde y viceversa. Un valor de 1 indica

una perfecta relación lineal entre el rojo y el verde, mientras que un valor de -1 indica una perfecta relación lineal entre ambos, pero de manera inversa (es decir que donde hay rojo no hay verde y donde hay verde no hay rojo). En otras palabras, Pearson nos indica cuánto colocizan dos sondas entre sí. Mientras que el significado de valores cercanos a 1 son sencillos de interpretar, los valores intermedios resultan más confusos (excepto cuando se estén comparando dos situaciones). La interpretación hecha a partir de Pearson se agrava aún más cuando una de las sondas suele ser mucho más abundante que la otra. En estos casos resultan útiles los análisis que contemplan por separado qué fracción de Rojo es coincidente con Verde y qué fracción de Verde es coincidente con Rojo. El coeficiente de colocización de Manders calcula un valor por cada color (M_1 y M_2) y es capaz de indicar qué fracción de una proteína está colocizando con una segunda proteína (o péptido en este caso). De esta manera M_1 calcula la fracción de Rojo en los sitios que contienen a Verde, y M_2 la fracción de Verde en los sitios que contienen a Rojo.

Estos coeficientes son simplemente calculados mediante las siguientes ecuaciones:

$$M_1 = \frac{\sum_p R_{p,coloc}}{\sum_p R_p} \quad (\text{Ec. 6}), \text{ donde } R_{p,coloc} = R_p \text{ si } V_p > 0 \text{ y } R_{p,coloc} = 0 \text{ si } V_p = 0$$

$$M_2 = \frac{\sum_p V_{p,coloc}}{\sum_p V_p} \quad (\text{Ec. 7}), \text{ donde } V_{p,coloc} = V_p \text{ si } R_p > 0 \text{ y } V_{p,coloc} = 0 \text{ si } R_p = 0$$

A diferencia de Pearson, Manders estrictamente mide la co-ocurrencia de Verde con Rojo y de Rojo con Verde, independientemente de la proporción existente de cada señal⁸³.

Análisis estadístico

La significancia estadística de los datos obtenidos fue evaluada usando test-T pareado de dos colas en los casos de dos grupos y ANOVA de una vía con correcciones post-hoc para tres grupos o más. Cuando las comparaciones se realizaron contra la condición control, se usó como post-test Dunnet y en los casos en que las comparaciones hayan sido entre grupos, Bonferroni. Para las comparaciones que involucrasen dos variables (por ejemplo tiempo y tamaño) se utilizó ANOVA de dos vías con los mismos post-tests. Los valores con P por debajo de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos que se grafican como la media $\pm$ desvío estándar (D.E.) corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes, mientras que los datos graficados como la media $\pm$ error estándar (E.E.) provienen de tres experimentos independientes. Todas las imágenes presentadas (Western Blot, microscopía) son representativas de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

Capítulo I: modulación del fenotipo maligno

Efecto anti-proliferativo en líneas celulares de NSCLC

Reportes previos describen los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos de CIGB-300 en distintas líneas tumorales^{64,84}. Con el fin de evaluar el efecto en NSCLC, monocapas de las líneas celulares humanas H125 y A549 y de la línea murina 3LL fueron tratadas con diferentes dosis del péptido.

Todas las líneas celulares respondieron al tratamiento con CIGB-300 de manera dosis dependiente, confirmando la efectividad de CIGB-300 en nuestro modelo (Figura 1). La línea celular H125 resultó la más sensible, siendo en primera instancia nuestro modelo de elección. Estos resultados, nos permitieron además definir las concentraciones de CIGB-300 a utilizar en los siguientes ensayos, seleccionándose una dosis baja (IC_{25}) de 80 μ M para 3LL, 60 μ M para H125 y 150 μ M para A549 y una dosis alta (IC_{50}) de 160 μ M para 3LL, 120 μ M para H125 y 300 μ M para A549).

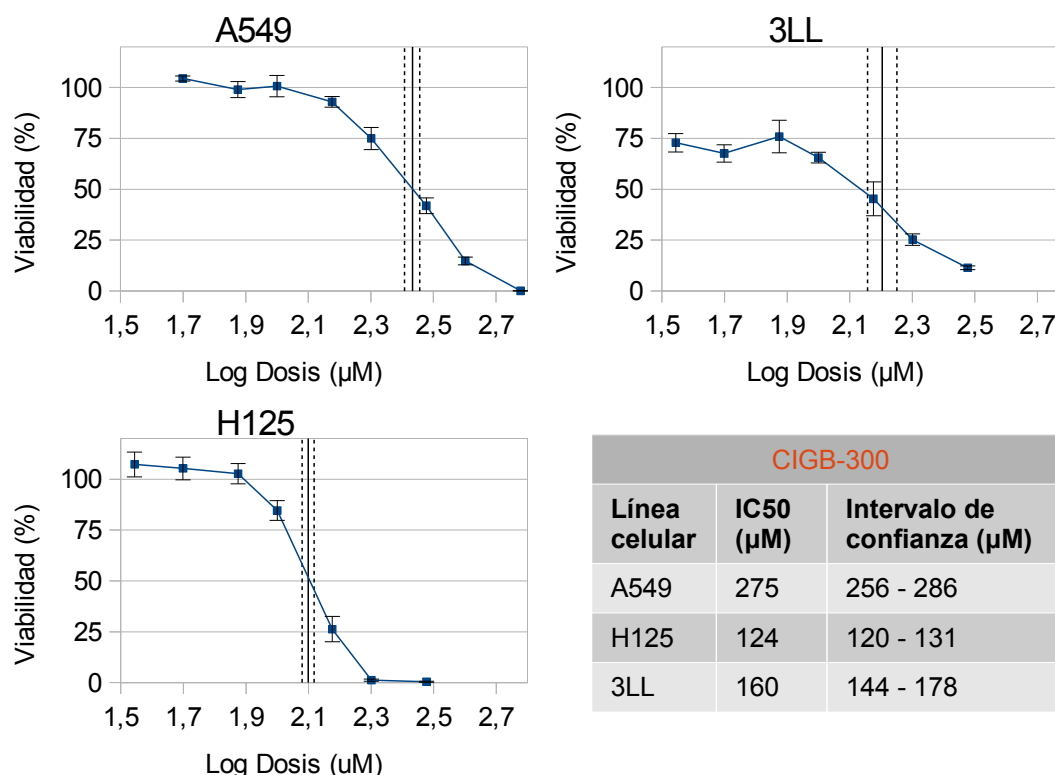


Figura 1: Curvas de inhibición de la proliferación mediada por CIGB-300 sobre líneas de NSCLC. Monocapas subconfluentes de cada línea fueron tratadas con distintas dosis de CIGB-300 durante 72h y se midió la viabilidad celular por el método de MTS. En el gráfico, la línea vertical indica la dosis correspondiente a la IC₅₀ para cada modelo celular y las líneas punteadas su intervalo de confianza, explicitados en la tabla. Cada valor representa la media ± E.E.

Análisis del mecanismo de muerte celular

Habiendo constatado una reducción en la capacidad proliferativa celular causada por CIGB-300 en forma dosis dependiente en las diferentes líneas de NSCLC, decidimos evaluar si la misma involucraba muerte celular y los posibles mecanismos subyacentes.

Para ello realizamos un ensayo de inmunofluorescencia marcando con AnexinaV-FITC/Ioduro de Propidio (IP) a la línea celular H125. Luego de una hora de tratamiento con la IC₅₀ de CIGB-300, pudimos detectar un aumento en el número de células apoptóticas tempranas y tardías, como así también de

Resultados

células necróticas, respecto de la condición basal (Figura 2). Los niveles de muerte celular observados resultaron similares a los obtenidos con el tratamiento por Etopósido, un inductor de apoptosis previamente caracterizado⁸⁵. La inducción de apoptosis también fue constatada en la línea A549 y se muestra más adelante (Capítulo III).

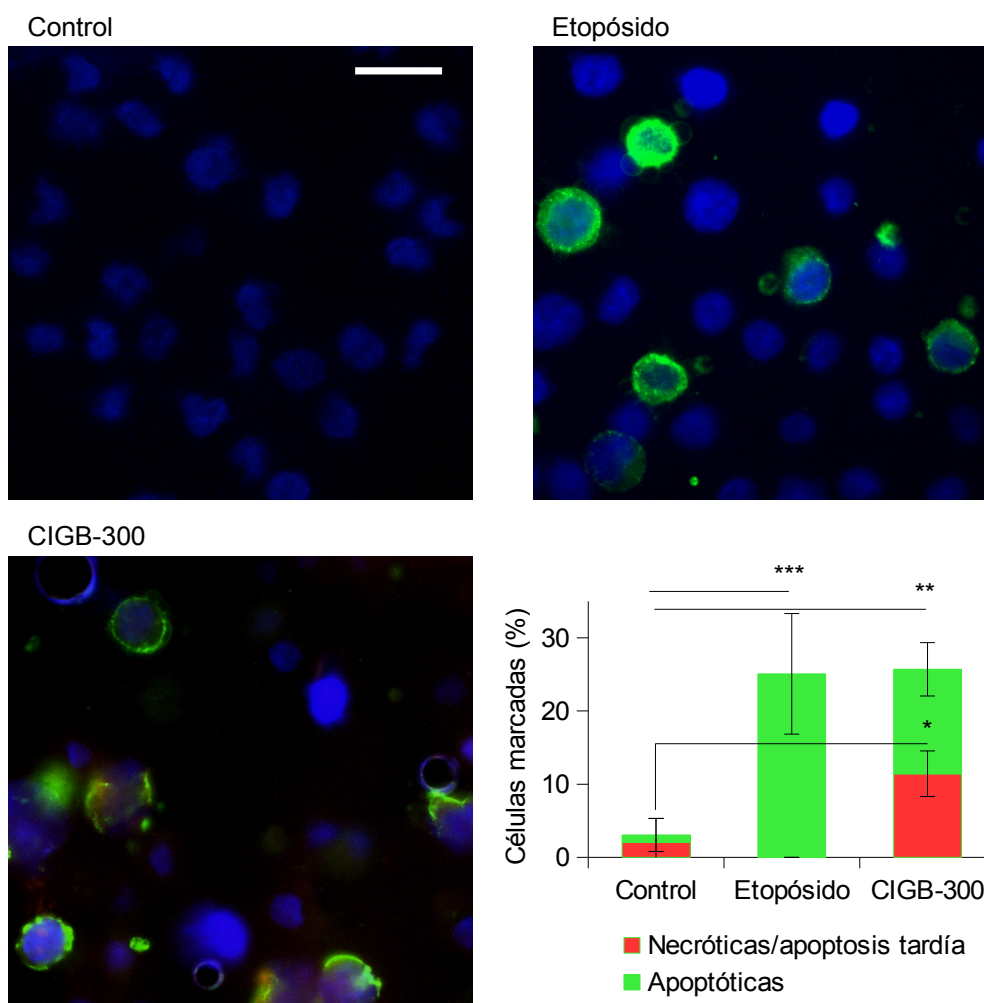


Figura 2: Ensayo de apoptosis por inmunofluorescencia con AnexinaV-FITC/IP. Monocapas subconfluentes de la línea H125 fueron tratadas 1h con CIGB-300 o durante 24h con Etopósido 10 μ M como control positivo de apoptosis. Barra de escala: 50 μ m. Los núcleos fueron visualizados con DAPI. El gráfico representa la media $\pm$ D.E. del porcentaje de células apoptóticas y apoptóticas tardías/necróticas para cada condición. * $p < 0,05$ vs. necróticas/apoptóticas tardías CIGB-300, ** $p < 0,01$ vs. apoptóticas CIGB-300 y *** $p < 0,001$ vs. apoptóticas Etopósido. ANOVA de 2 vías.

Efecto antiproliferativo en cultivos 3D

Dado que los esferoides de células tumorales son un buen modelo para el estudio *in vitro* del *delivery* de drogas a tumores de estadíos tempranos avasculares, como así también micrometástasis⁸⁶, la efectividad de CIGB-300 fue evaluada en este tipo de cultivos tridimensionales.

Para ello desarrollamos el modelo de esferoides en la línea H125, mediante la técnica de la gota pendiente. En una primera instancia se evaluó la cantidad inicial de células a utilizar, trazándose curvas de crecimiento de 250 a 8000 células (Figura 3). Los esferoides formados a partir de 4000 y 8000 células no fueron capaces de mantenerse a lo largo del tiempo. Los esferoides formados a partir de 1000 células presentaron una tasa de crecimiento sostenida en el tiempo, manteniendo la compactación y la forma, por lo que se seleccionó esta condición inicial para los tratamientos subsiguientes. Como se puede apreciar al pie de la figura 3, luego de 7 días de cultivo, los esferoides desarrollaron un centro oscuro y denso de células mayoritariamente necróticas, consecuencia de la menor disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

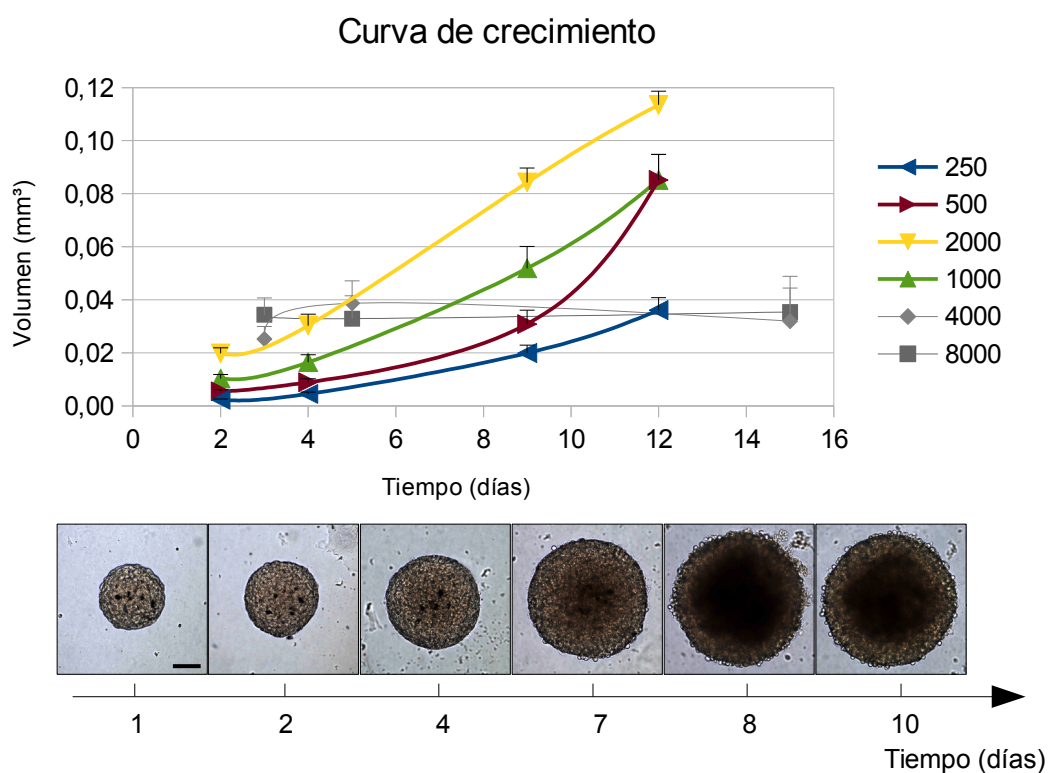


Figura 3: Cinética de crecimiento de esferoides formados a partir de distintos números iniciales de células. Se grafica la media $\pm$ D.E. Se muestran imágenes representativas del crecimiento en el tiempo de esferoides formados a partir de 1000 células (abajo). Escala: 100 μ m.

Las dosis de IC₂₅ e IC₅₀ previamente obtenidas en monocapa fueron usadas para tratar a los esferoides de la línea H125. A partir de las 48h de formados los esferoides, se comenzó el tratamiento con CIGB-300. Pudimos observar una significativa reducción en el volumen de los esferoides luego de 5 días de tratamiento respecto al de los esferoides sin tratar. Resulta interesante notar que al día 7, el volumen de los esferoides afectados disminuyó drásticamente, alcanzando incluso su volumen inicial en el caso de aquellos tratados con la IC₅₀. (Figura 4).

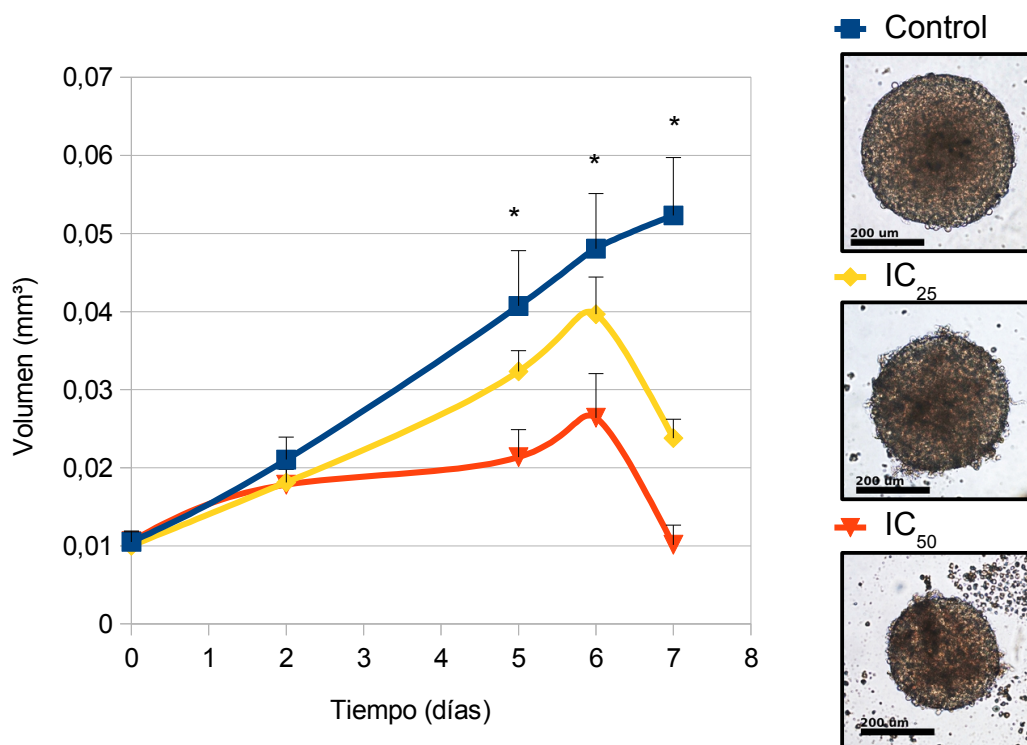


Figura 4: Curva de crecimiento de esferoides de la línea H125 tratados o no con CIGB-300. Se grafica la media $\pm$ D.E. * $p < 0,001$ vs. esferoides tratados, ANOVA de 2 vías (izquierda). Imágenes representativas tomadas luego de 5 días de tratamiento, barra de escala: 200 μ m (derecha).

Estudio de internalización en esferoides

La capacidad de CIGB-330 de inhibir el crecimiento de los cultivos tridimensionales nos motivó a estudiar de qué manera el péptido ejercía su efecto; el hecho de no necesitar una dosis mayor a la usada en monocapa para producir la inhibición en el crecimiento muestra una ventaja de este tratamiento frente a otras estrategias terapéuticas que sí lo requieren. Esto podría estar relacionado con la capacidad de CIGB-300 de penetrar en las estructuras compactas de los esferoides, donde la mayoría de los agentes quimioterapéuticos fallan en conseguir una rápida y efectiva entrada⁸⁷⁻⁹⁰. Para evaluar esta posibilidad, esferoides de la línea H125 fueron tratados por

Resultados

distintos tiempos con una variante biotilnada del péptido que permite su visualización, con el fin de realizar una cinética de internalización. Pudimos observar marca del péptido en las capas más externas de los esferoideos a partir de los 5min y la completa penetración luego de 60min de tratamiento (Figura 5).

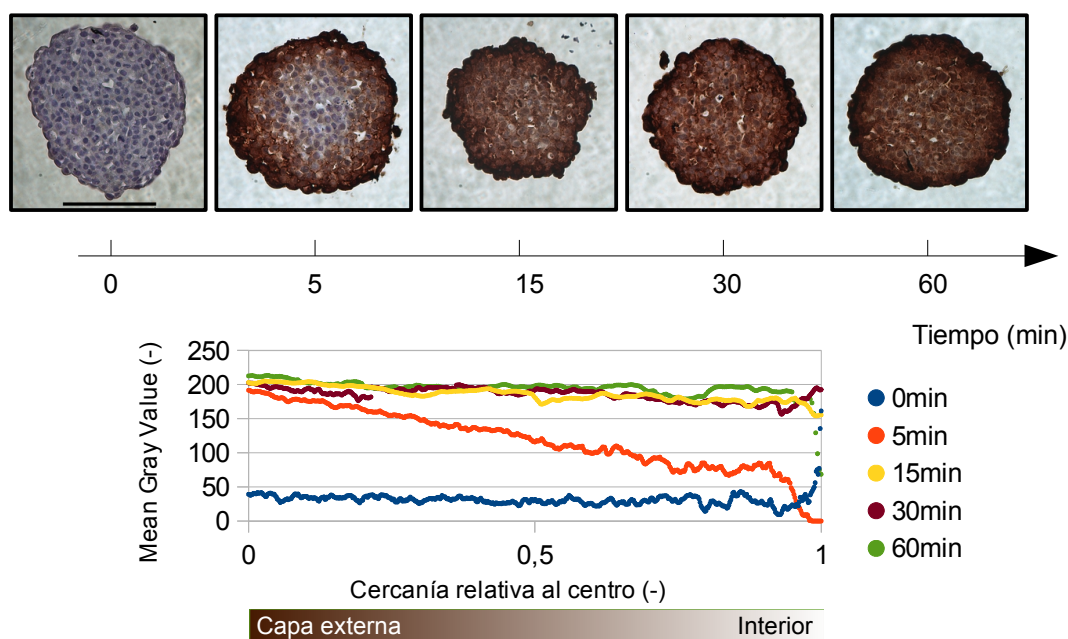


Figura 5: Estudio de internalización en esferoideos. Utilizando una versión biotilnada de CIGB-300, esferoideos de la línea H125 fueron tratados a lo largo de 60min y visualizados mediante inmunocitoquímica. Barra de escala: 100µm (arriba). La inmunopositividad fue cuantificada en función de la distancia relativa al centro de cada esferoide (abajo).

Otros efectos asociados con la progresión maligna

Tras estudiar la alteración en la capacidad proliferativa de las líneas NSCLC frente al tratamiento con CIGB-300 en monocapa y esferoideos, decidimos explorar otros eventos importantes en la progresión como el potencial migratorio y la actividad proteolítica.

El aumento en la secreción y en la activación de proteasas, junto a la capacidad de migrar de las células tumorales, representan pasos críticos en el

Resultados

proceso de invasión y colonización del órgano blanco. Pudimos constatar que dosis bajas de CIGB-300 redujeron la capacidad migratoria y la actividad de MMP-2 y uPA en las líneas 3LL y H125 (Figura 6).

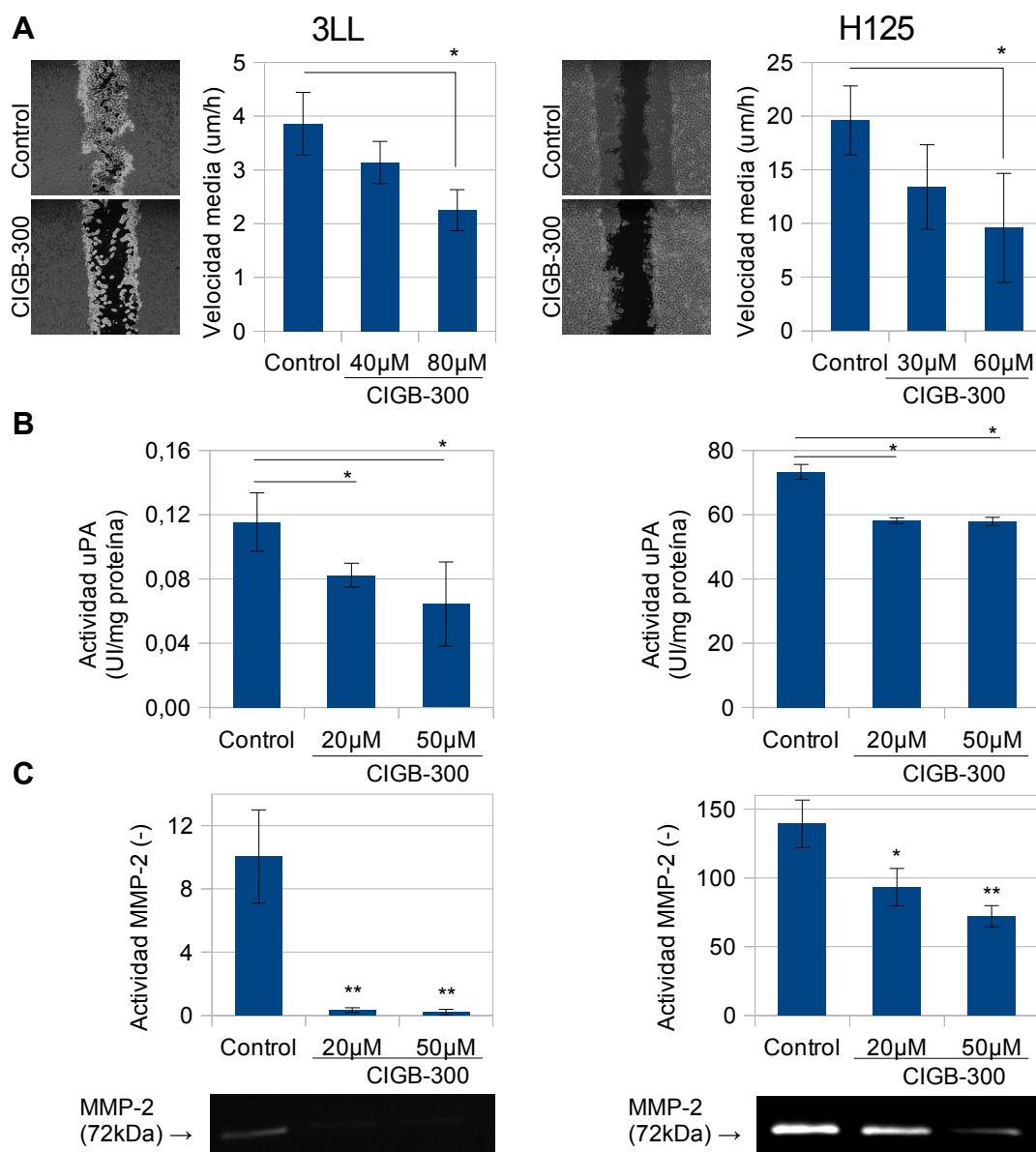


Figura 6: Capacidad migratoria y secreción de enzimas proteolíticas en las líneas 3LL (columna izquierda) y H125 (columna derecha). Panel A: Monocapas confluentes de 3LL y H125 fueron “heridas” y tratadas o no CIGB-300 durante 20h y 7h respectivamente. La distancia promedio recorrida por cada frente de avance fue relativizado al tiempo de migración. Se muestran

*imágenes representativas en las que se puede observar el área cubierta por el frente de avance respecto al área libre de células inicial para cada condición. Los datos son expresados como la media $\pm$ D.E. * $p < 0,05$ ANOVA. Panel B: Ensayo de caseinólisis radial. Se midió la actividad de la uPA secretada en el medio condicionado de células tratadas o no con CIGB-300. Los datos son expresados como la media $\pm$ D.E. * $p < 0,05$ ANOVA. Panel C: Zimografía. La actividad de MMP-2 secretada al medio condicionado fue evaluada luego de tratar a las células con distintas dosis de CIGB-300. Los datos son expresados como la media $\pm$ D.E. * $p < 0,05$ y * $p < 0,01$ ANOVA. En todos los casos las dosis usadas son iguales o menores a la IC₂₅ para cada línea.*

Capítulo II: Vías de señalización dependientes de CK2

Eje Wnt/ β -catenina

Dado que CK2 posee más de 300 sustratos intracelulares¹⁸, diversas vías de señalización podrían encontrarse alteradas por el tratamiento con CIGB-300¹⁶. En base a lo reportado por otros autores y expuesto a lo largo de la introducción, las vías de Wnt/ β -catenina y NF- κ B canónica se encuentran entre los ejes más relevantes a través de los cuales CK2 estaría ejerciendo su rol pro-tumoral, debido al importante aporte que ambas tienen en la supervivencia y la inhibición de la apoptosis⁹¹. Es por esta razón que hemos centrado nuestro estudio principalmente en estas dos vías.

Como se mencionó anteriormente (Introducción, Figura 7), en la vía canónica de Wnt, CK2 fosforila y estabiliza a β -catenina, provocando su acumulación en el citoplasma y permitiendo su translocación al núcleo para la transcripción de genes blanco³⁵. Esto significa que la acumulación (o en su defecto el descenso) en citoplasma es indicativa de la activación de la vía (o de la inhibición).

En una primera instancia evaluamos por WB los niveles proteicos totales de β -catenina en la línea H125. Pudimos constatar que los mismos no se modularon luego del tratamiento con CIGB-300 (Figura 7A). Quisimos entonces analizar si la translocación al núcleo de β -catenina se encontraba alterada por CIGB-300. La acumulación de β -catenina fue estudiada tanto en condiciones basales como de estimulación de la vía. Para ello tratamos a las células H125 con MC de células L, fibroblastos murinos que producen y secretan la proteína wnt3a, uno de los ligandos del receptor Frizzled. Observamos que, luego del tratamiento con MC conteniendo el factor wnt3a, la β -catenina se acumulaba en el citoplasma, mientras que este efecto no se observaba cuando tratábamos con MC control (proveniente de células L no productoras de wnt3a). Verificamos de esta manera que la acumulación citoplasmática de β -catenina fue producto de la activación canónica de la vía por el factor wnt3a (Figura

Resultados

7B). Finalmente evaluamos el efecto de CIGB-300 en la modulación de los niveles de β -catenina citoplasmática tanto en condiciones basales como en presencia del factor wnt3a. Pudimos verificar que los niveles basales de β -catenina no se redujeron luego del tratamiento durante 6h con una baja dosis de CIGB-300. Sin embargo, en presencia del factor wnt3a, el péptido CIGB-300 revirtió parcialmente la acumulación citoplasmática de β -catenina (Figura 7C), sugiriendo que CIGB-300 se encuentra involucrado en el bloqueo de la señalización mediada por β -catenina en esta condición. El tratamiento con el inhibidor competitivo de CK2, TBB⁹², produjo efectos similares a los obtenidos con CIGB-300 en la acumulación de β -catenina, tanto en condiciones basales como en presencia del factor wnt3a.

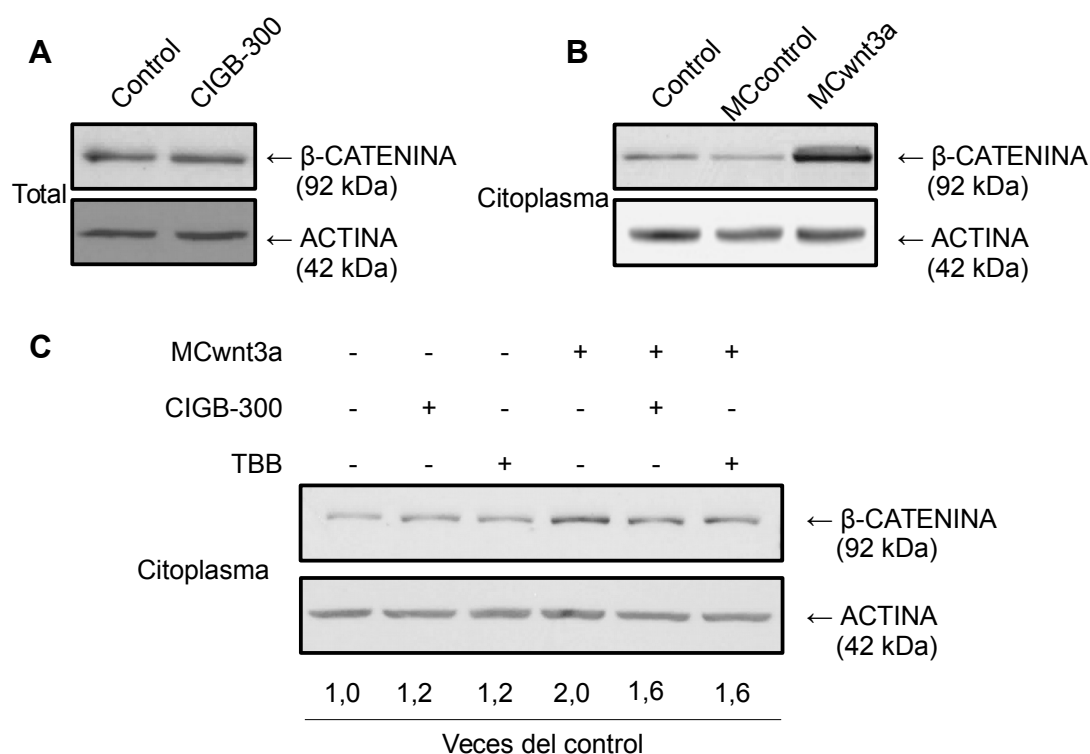


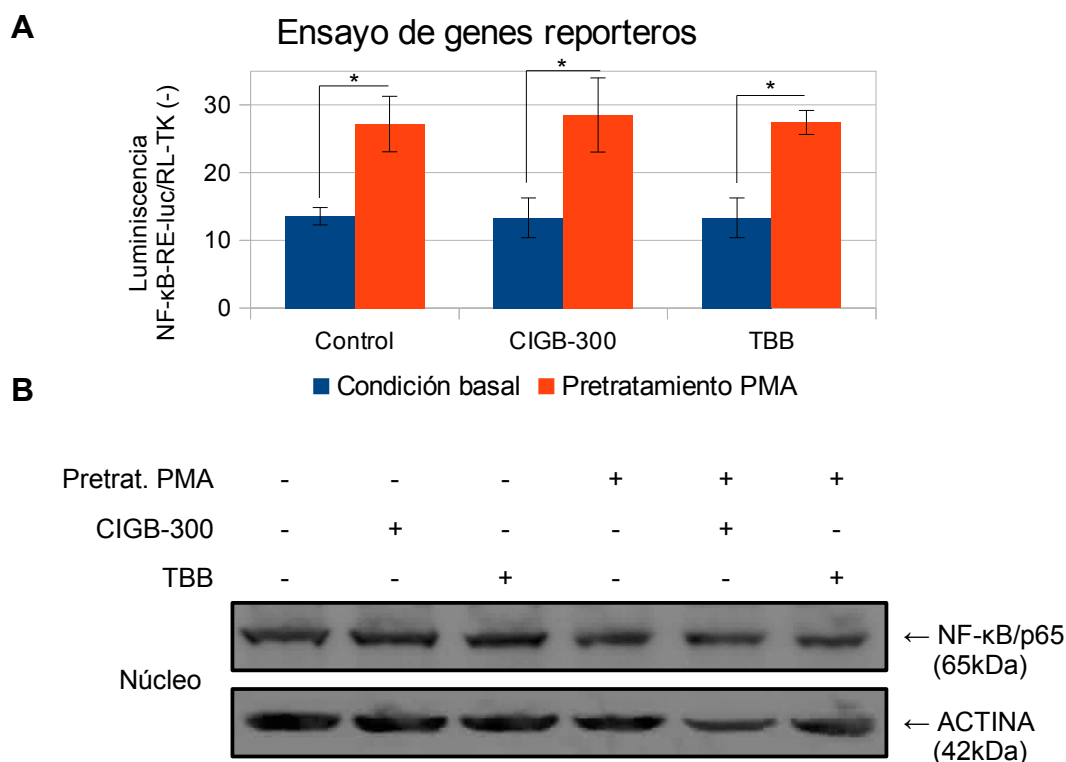
Figura 7: Vía de señalización Wnt/ β -catenina. Panel A: extractos totales preparados a partir de células H125 tratadas con baja dosis de CIGB-300 se analizaron por Western blot para β -catenina. Panel B: Las células H125 fueron tratadas con MC de células L productoras o no del factor wnt3a. Extractos

citoplasmáticos se analizaron como en A. Panel C: las células H125 fueron incubadas o no con MC conteniendo el factor wnt3a y luego tratadas con dosis bajas de CIGB-300 o TBB. Los extractos citoplasmáticos se analizaron como en A. Se detallan las veces de cambio en función de la condición control. En todos los casos los niveles proteicos de Actina se utilizaron como control de carga.

Eje NF- κ B

La activación de la vía canónica de NF- κ B es promovida por la fosforilación de CK2, evento que favorece la translocación nuclear del complejo NF- κ B. Nos propusimos entonces estudiar si CIGB-300 era capaz de modular este proceso.

En una primera instancia evaluamos en la línea H125 mediante WB y ensayo de genes reporteros los niveles nucleares de la subunidad p65 de NF- κ B y la actividad del elemento de respuesta a NF- κ B (NF- κ B-RE) luego del tratamiento con CIGB-300, tanto en condiciones basales como de estimulación de la vía. En este primer enfoque imitamos las condiciones de tratamiento que fueron usadas para estudiar la modulación en β -catenina, con la salvedad de que en este caso utilizamos como inductor al éster de forbol PMA, que a través de la activación de PKC fosforila a IKK⁹³, induciendo la consiguiente activación de la vía. Realizamos entonces un tratamiento secuencial de 24h con PMA, seguido de 6h con CIGB-300 (tratamiento largo). Pudimos constatar que el pretratamiento con PMA aumentó significativamente la actividad del NF- κ B-RE. El tratamiento con CIGB-300 no produjo ningún efecto en los niveles basales de actividad, ni tampoco fue capaz de alterar el aumento producido por el pretratamiento con PMA (Figura 8A). En estas condiciones, tampoco pudimos observar alteraciones en los niveles nucleares de p65 por WB (Figura 8B).



*Figura 8: Estudio del eje NF-κB a tiempos largos de tratamiento. Células H125 se trataron o no con una dosis baja de CIGB-300 en condiciones basales o de previa estimulación de la vía con PMA. Panel A: actividad luciferasa de firefly normalizada a la actividad luciferasa constitutiva de Renilla luego de la transfección transitoria con los vectores pNF-κB-RE-luc y pRL-TK-luc. Los datos se expresan como la media $\pm$ D.E. * $p < 0,0001$, ANOVA. Panel B: Western blot para p65 de extractos nucleares. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.*

Dado que la translocación de proteínas al núcleo sucede en cuestión de minutos, decidimos explorar el efecto de los tratamientos a tiempos más cortos. Para ello realizamos un ensayo preliminar tratando las células con CIGB-300 y PMA durante 15, 30 y 45min, esta vez evaluando el efecto de la combinación de ambos. Medimos nuevamente los niveles nucleares de p65 por WB y observamos en este caso que el estímulo con PMA indujo un aumento en los niveles de p65 nuclear en todos los tiempos estudiados, constatando la activación de la vía. A su vez, en condiciones basales, el tratamiento con CIGB-300 a 15 y 30min redujo notoriamente los niveles nucleares de p65. En todos

Resultados

los casos también, el CIGB-300 bloqueó la translocación nuclear de p65 inducida por PMA, presentando a los 30 y 45min niveles inferiores a los observados en la condición basal (Figura 9).

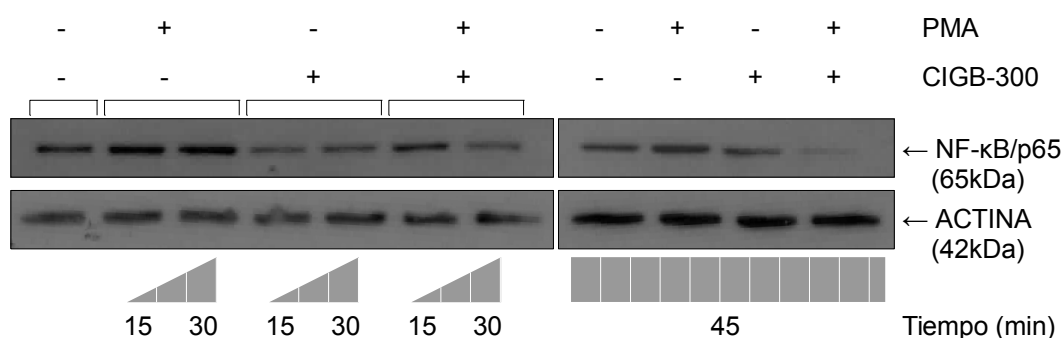


Figura 9: Estudio del eje NF-κB a tiempos de tratamiento cortos. Células H125 fueron tratadas durante 15, 30 y 45min con una dosis baja de CIGB-300, PMA, o la combinación de ambos. Los extractos nucleares se analizaron por WB para p65. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

A partir de la curva de tiempo obtenida, se repitieron los tratamientos a 15min y se analizó más en detalle la distribución de p65 en los distintos compartimentos celulares. Como se muestra en la Figura 10, dosis bajas de CIGB-300 redujeron los niveles nucleares de la proteína p65 del complejo NF-κB en las células H125, mientras que produjeron su acumulación en el citoplasma sin alterar los niveles proteicos totales, confirmando la inhibición de la vía canónica. Más aún, este efecto inhibitorio fue sostenido incluso tras el agregado de PMA. Resultados similares se obtuvieron para la línea A549 y son mostrados en el capítulo siguiente.

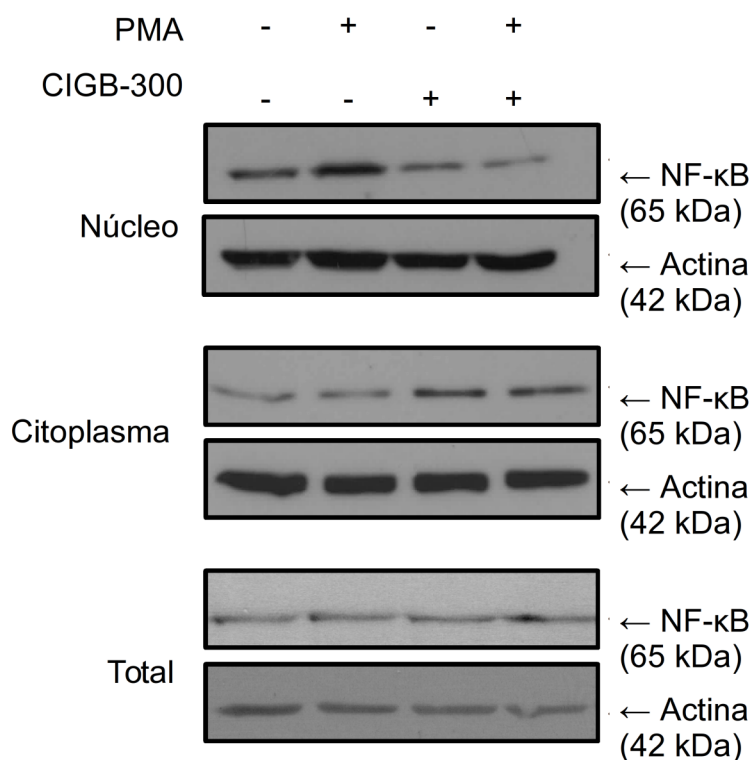


Figura 10: Distribución subcelular de p65. Extractos nucleares, citoplasmáticos y totales preparados a partir de células H125 tratadas o no con CIGB-300, PMA o su combinación durante 15min se analizaron por WB para p65. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

A fin de verificar los resultados obtenidos por otra técnica, realizamos marcaciones de p65 por inmunofluorescencia, repitiendo el mismo esquema de tratamiento. En condiciones basales, el tratamiento con CIGB-300 redujo la intensidad de señal nuclear de p65. A su vez, luego del tratamiento con PMA, las células H125 presentaron núcleos con una clara marcación para p65. El tratamiento combinado con CIGB-300 redujo significativamente la cantidad de núcleos positivos (Figura 11).

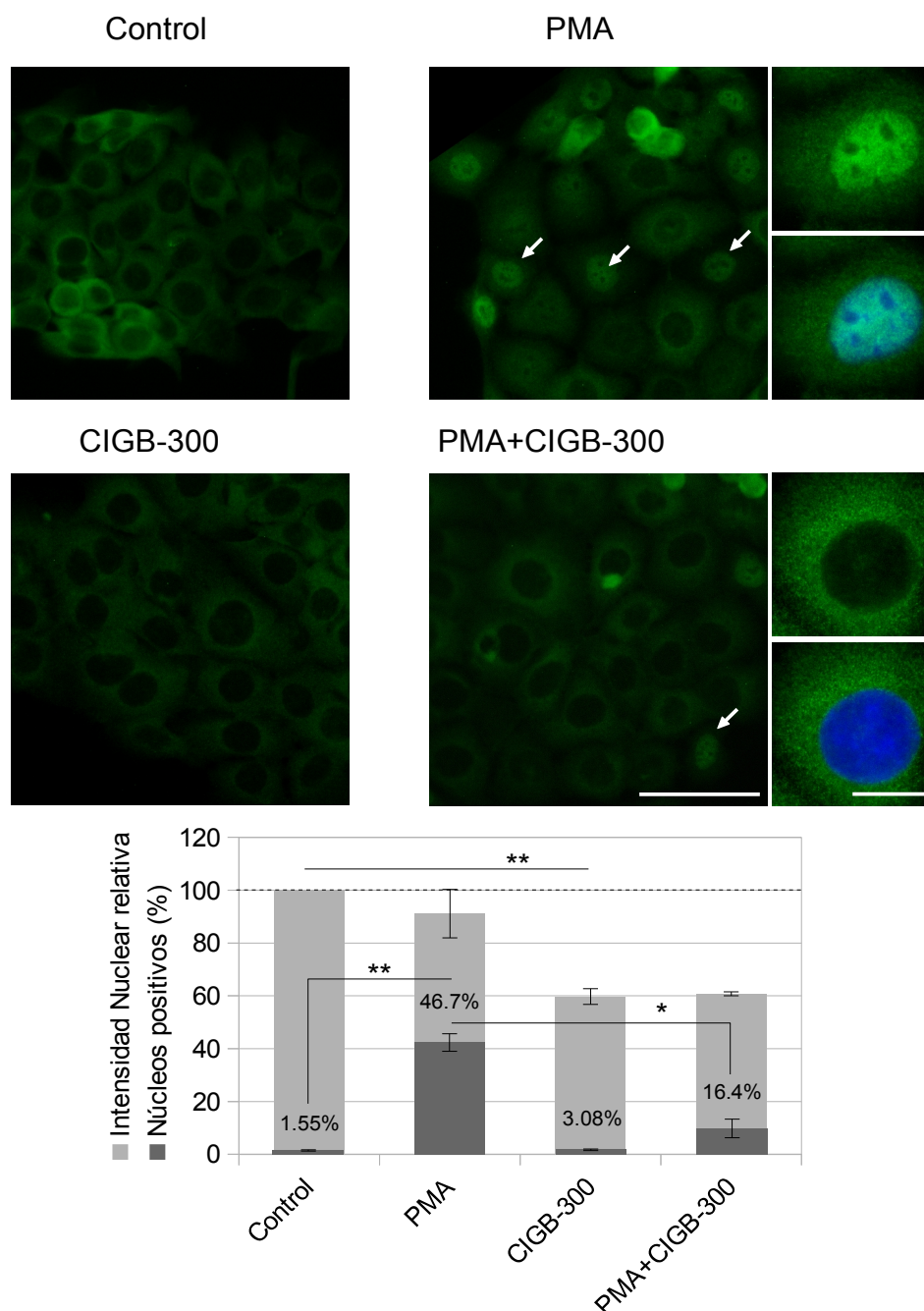


Figura 11: Distribución subcelular de p65 por inmunofluorescencia. Células H125 tratadas o no durante 15min con CIGB-300, PMA o su combinación, se inmunomarcaron para p65 y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Barra de escala: 50µm. Las flechas blancas indican núcleos positivos. Se muestran imágenes representativas de células individuales a mayor aumento y con los núcleos teñidos con DAPI, de los tratamientos con PMA en combinación o no con CIGB-300 Barra de escala: 5µm. La intensidad de marca nuclear fue medida y representada como porcentaje de las células control

(columnas gris claro). $**p<0,01$ vs. células tratadas con CIGB-300, ANOVA. Las columnas gris oscuro muestran el porcentaje de aquellas células con núcleos positivos (flechas blancas). $**p<0,01$ vs. células tratadas con PMA y $*p<0,05$ células tratadas con PMA+CIGB-300 vs. células tratadas con PMA, ANOVA. Se grafica la media $\pm$ E.E.

Habiendo confirmado por WB y por inmunofluorescencia la alteración de la vía canónica de NF- κ B por CIGB-300, decidimos evaluar si este tratamiento tenía algún efecto sobre la activación del NF- κ B-RE cuando lo combinábamos con PMA. Pudimos determinar que CIGB-300 bloqueó el efecto de PMA sobre la activación de NF- κ B-RE cuando tratábamos simultáneamente con ambas drogas (Figura 12A), indicando que la transcripción de los genes blanco de NF- κ B se encontraría afectada. Estudiamos entonces los niveles proteicos de distintos genes cuya expresión se ha descrito como dependiente de la actividad de NF- κ B. El tratamiento durante 2h con CIGB-300 disminuyó notablemente los niveles de las ciclinas D1 y E, mientras que aumentó los de la proteína pro-apoptótica BAX (Figura 12B). Los efectos sobre las proteínas blanco de esta vía se observaron también en la línea A549 y se muestran en el capítulo siguiente.

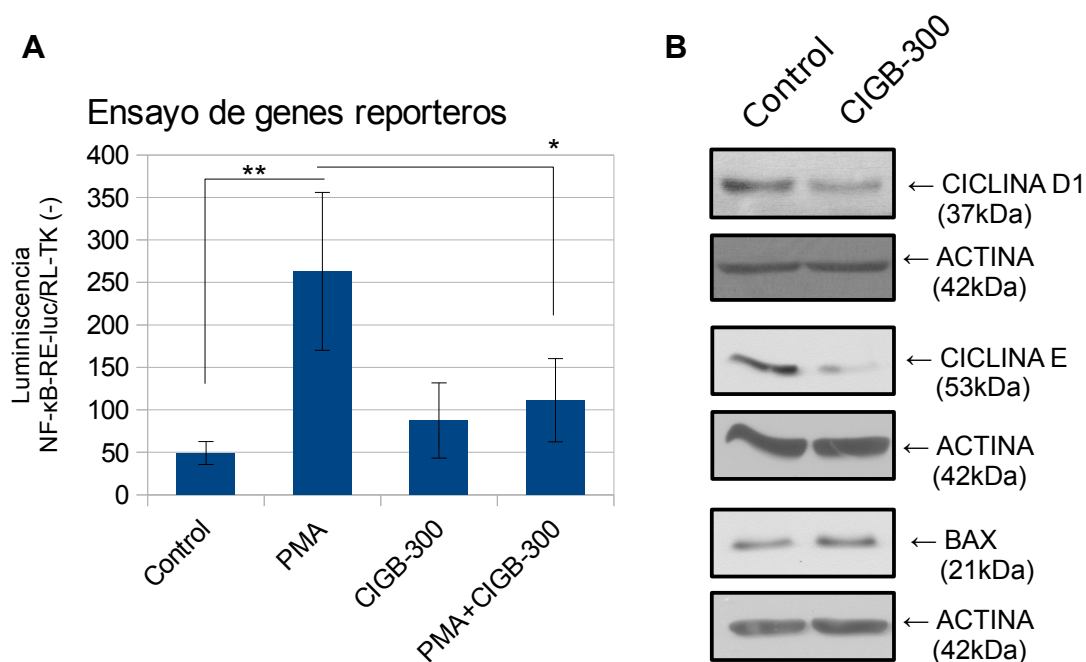


Figura 12: Efectos genómicos sobre la vía de NF-κB. **Panel A:** células H125 previamente transfectadas transitoriamente con los vectores pNF-κB-RE-luc y pRL-TK-luc fueron tratadas con CIGB-300, PMA o su combinación. La actividad luciferasa de firefly fue normalizada a la actividad luciferasa constitutiva de Renilla. Los datos se expresan como la media ± D.E. ** $p < 0,01$ y $p < 0,05$, ANOVA. **Panel B:** Extractos totales preparados a partir de células H125 tratadas o no con CIGB-300 por 2h se analizaron mediante WB para las ciclinas D1 y E y para BAX. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

Mecanismos de inhibición de la vía NF-κB

A continuación analizamos qué intermediarios de la vía o procesos podrían encontrarse afectados, de manera de tratar de profundizar en el mecanismo ejercido por CIGB-300.

Comenzamos estudiando dos de las regulaciones más directas que se ejercen sobre p65 y que podrían estar siendo afectadas por CIGB-300, que son el secuestro por su inhibidor, IκB-α, y la fosforilación en la Ser529 ejercida por CK2. Para ello tratamos células H125 durante 15min con CIGB-300, PMA o su

Resultados

combinación. El tratamiento con PMA redujo los niveles totales de IκB-α, evento que es consecuente con la activación de la vía previamente observada. Por el contrario, CIGB-300 no ejerció ningún efecto sobre IκB-α (Figura 13, panel superior). En relación a la fosforilación de p65 (Ser529), pudimos observar que PMA indujo un leve aumento en los niveles basales de fosforilación, mientras que CIGB-300 no produjo modulación alguna (Figura 13, panel inferior izquierdo).

Dado que la fosforilación de p65 mediada por CK2 se ha descrito como dependiente de TNF-α^{44,94}, repetimos el ensayo en presencia de esta citoquina. TNF-α indujo un importante aumento en los niveles de fosforilación de p65, los cuales fueron bloqueados en gran medida por CIGB-300 (Figura 13, panel inferior derecho).

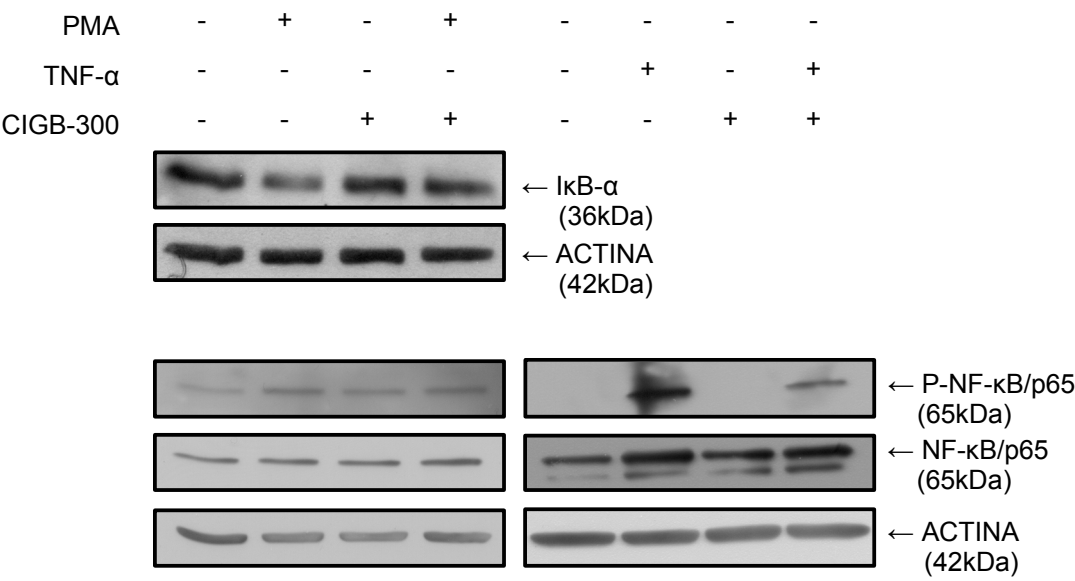


Figura 13: Intermediarios de señalización de NF-κB. Extractos totales preparados a partir de células H125 tratadas con CIGB-300 en combinación o no con PMA o TNF-α se analizaron mediante WB para IκB-α, P-p65 y p65. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

El bloqueo por parte de CIGB-300 sobre la fosforilación de p65 inducida por TNF- α representa una evidencia importante acerca de la disrupción que estaría ejerciendo el péptido entre CK2 y su sustrato p65. Sin embargo resulta insuficiente para explicar la inhibición de la vía observada tanto en condiciones basales como de estimulación con PMA. En la misma línea, el inhibidor I κ B- α tampoco pareciera estar involucrado en este efecto. Esto nos conduce a pensar que otros mecanismos de regulación adicionales deben estar siendo alterados. La atenuación en la señalización de NF- κ B dentro del núcleo podría ser uno de ellos. Como mencionamos en la introducción, este mecanismo de regulación ocurre a través de la degradación de p65 por el complejo del proteasoma⁵⁹. Además, evidencias previas sugieren que el tratamiento con CIGB-300 podría estar afectando a este complejo. En este sentido, se observó en la línea H125 mediante ensayo de *pull-down* que CIGB-300 co-precipita con la subunidad α 7/C8 del proteasoma, que a su vez es un sustrato de CK2.

A fin de explorar el vínculo entre CIGB-300 y α 7/C8, analizamos la distribución subcelular de ambos. Para ello tratamos a las células H125 durante 30min con una dosis baja de la variante biotinilada de CIGB-300 para posteriormente ser visualizada, junto a α 7/C8, mediante inmunofluorescencia confocal. La proteína α 7/C8 se localizó mayoritariamente en citoplasma, en contraste con CIGB-300, que fue hallado tanto en el compartimento citoplasmático como en el nuclear. Cerca de un tercio de las células presentaron fuerte marca de CIGB-300 en el núcleo, mientras que el resto mostraba señal citoplasmática, mayormente ubicada en el área perinuclear. En este último grupo de células, se evidenció una alta co-ocurrencia entre CIGB-300 y α 7/C8. Más del 80% de la marca de α 7/C8 fue coincidente con la presencia de CIGB-300 (Figura 14), confirmando la asociación entre CIGB-300 y el sustrato de CK2 y la subunidad del proteasoma α 7/C8.

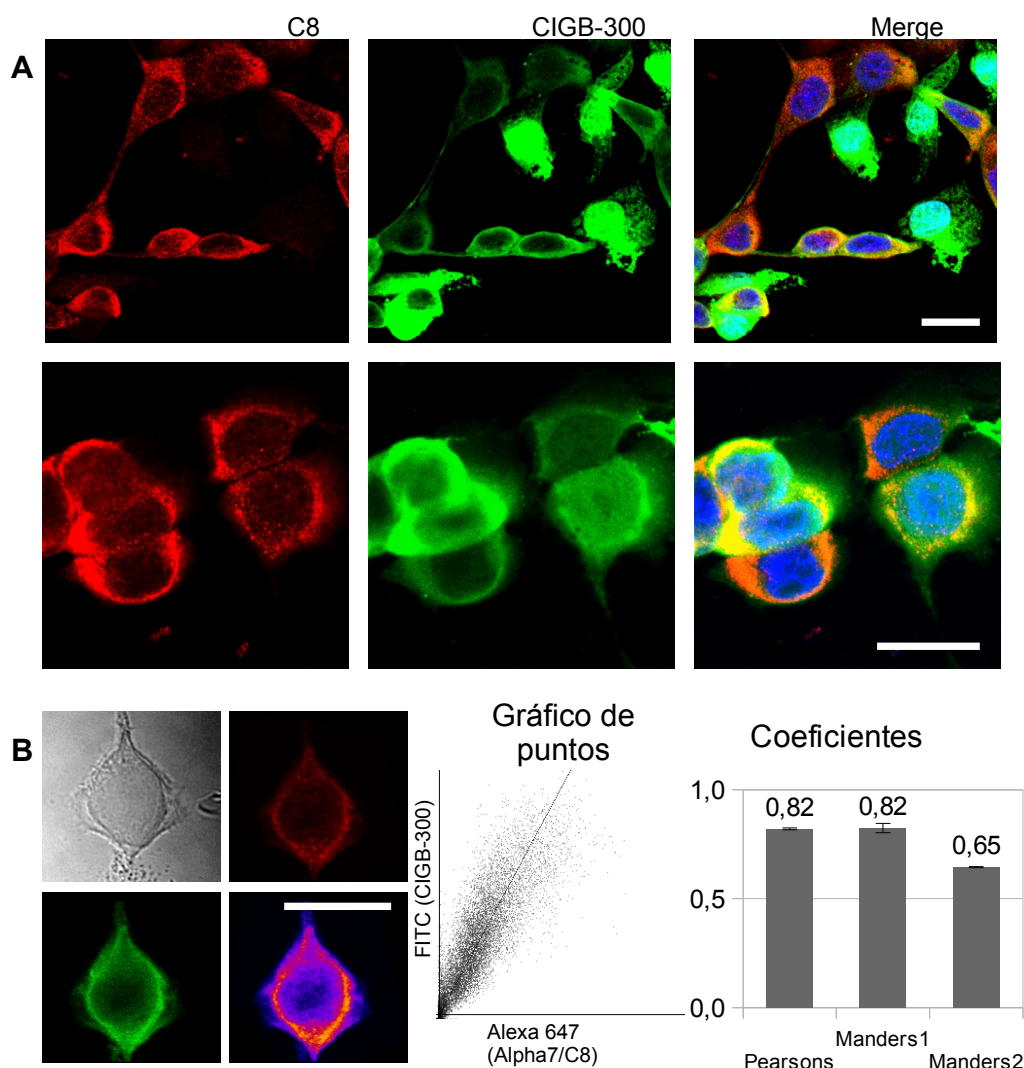


Figura 14: Distribución subcelular de CIGB-300 y de la proteína $\alpha 7/C8$ del proteasoma. Panel A: Fluorescencia confocal de células H125 tratadas con CIGB-300 biotinilado visualizado con estreptavidina FITC (verde) e inmunomarcación para $\alpha 7/C8$ (rojo, Alexa647). Panel B: análisis de célula única para los coeficientes de Pearson y Manders. Se muestra un mapa de colocalización para una célula representativa junto al gráfico de puntos con la distribución de ambos fluoróforos. Los valores de los coeficientes calculados a partir de 20 células son expresados como la media $\pm$ E.E.

Lo siguiente a analizar fue si CIGB-300 ejercía algún efecto sobre la actividad proteolítica del complejo del proteasoma. Para ello realizamos un ensayo utilizando un sustrato modelo que es reconocido por el proteasoma y cuya degradación conduce a la emisión de luminiscencia. Como control positivo

Resultados

usamos al inhibidor del proteasoma Bortezomib, determinando previamente su IC_{50} para la viabilidad de las H125 a 72h y definiendo esa dosis como la de uso.

Observamos que CIGB-300 incrementó al doble la actividad del proteasoma, mientras que, como era esperado, el Bortezomib la inhibió fuertemente (Figura 15).

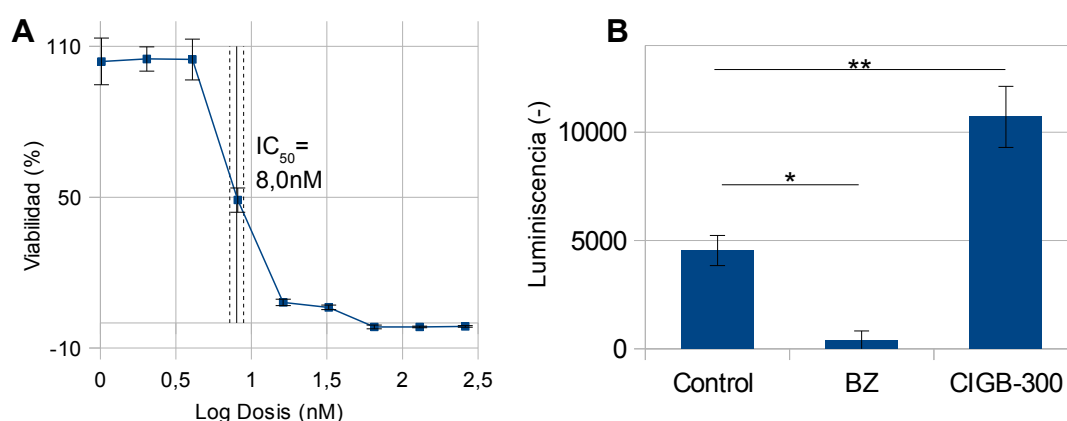


Figura 15: Actividad del proteasoma. Panel A: Curva de inhibición de la proliferación por Bortezomib (BZ) para H125. Monocapas subconfluentes fueron tratadas con distintas dosis de BZ durante 72h y se midió la viabilidad celular por el método de MTS. Cada valor representa la media $\pm$ D.E. La línea vertical indica la dosis correspondiente a la IC_{50} , explicitada en el gráfico, y las líneas punteadas su intervalo de confianza. Panel B: Determinación de la actividad del proteasoma usando el kit "Proteasome-Glo™". Células H125 se trataron por 30min con una dosis baja de CIGB-300 o por 4h con 8,0nM de BZ como control positivo. Los datos fueron expresados como la media $\pm$ E.E. * $p < 0,05$ vs. células tratadas con BZ y ** $p < 0,01$ vs. células tratadas con CIGB-300, ANOVA.

Finalmente quisimos determinar si el hecho de interrumpir la degradación proteasomal rescataba a las células del efecto causado por CIGB-300 sobre la modulación de los niveles nucleares de p65. Para tal fin pretratamos a la línea H125 con BZ, puesto que ya habíamos verificado que era capaz de afectar fuertemente la actividad del proteasoma. Mediante WB pudimos observar que el BZ no afectó los niveles de p65 nuclear. Por otra parte, el pre-tratamiento

Resultados

con este inhibidor del proteasoma fue capaz de revertir el descenso en los niveles nucleares de p65 causado por CIGB-300 (Figura 16).

En conjunto estos resultados nos indican que la actividad proteasomal es necesaria para la modulación de NF- κ B por CIGB-300.

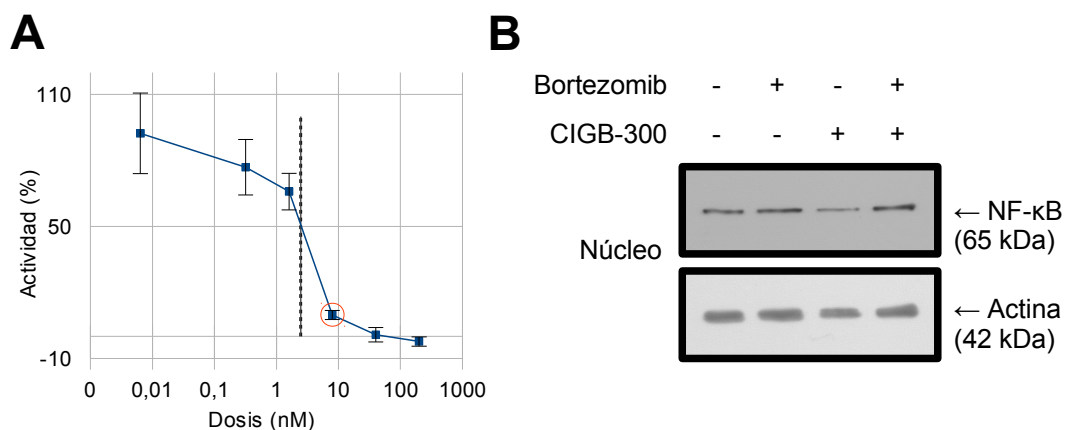


Figura 16: Niveles de p65 nuclear y degradación proteasomal. Panel A: curva de inhibición de la actividad del proteasoma por tratamiento durante 4h con Bortezomib. Cada valor representa la media $\pm$ D.E. En rojo se remarca la dosis 8,0nM usada en B. Panel B: Extractos nucleares preparados a partir de células H125 pre-tratadas durante 4h con Bortezomib y luego 15min con CIGB-300 se analizaron mediante WB para p65. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

Capítulo III: quimiorresistencia en NSCLC

Cisplatino y NF- κ B

El cisplatino continúa siendo la quimioterapia estándar para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón. Como se comentó en la introducción, está reportado el vínculo entre la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino y la activación de la señalización de NF- κ B. La activación de esta vía de supervivencia en las células tumorales las rescataría de la apoptosis y sería por ende uno de los mecanismos responsables de la resistencia adquirida al tratamiento.

Dado que CIGB-300 previno la translocación nuclear de NF- κ B, incluso en presencia de un estímulo activador, pensamos que podría aportar un beneficio adicional a la quimioterapia, ya sea evitando la inducción de este mecanismo de escape, como siendo más efectivo en tumores que hayan adquirido una mayor dependencia a la vía. Nos propusimos entonces explorar *in vitro* diversas estrategias terapéuticas basadas en cisplatino y CIGB-300.

En una primera instancia analizamos qué sucedía con los niveles nucleares de p65 si tratábamos a la línea con cisplatino. Determinamos la IC₅₀ para cisplatino de las células H125, y tratamos con esa dosis durante 15 y 30min. Observamos que las células expuestas a cisplatino presentaron un importante incremento en los niveles nucleares de p65 (Figura 17).

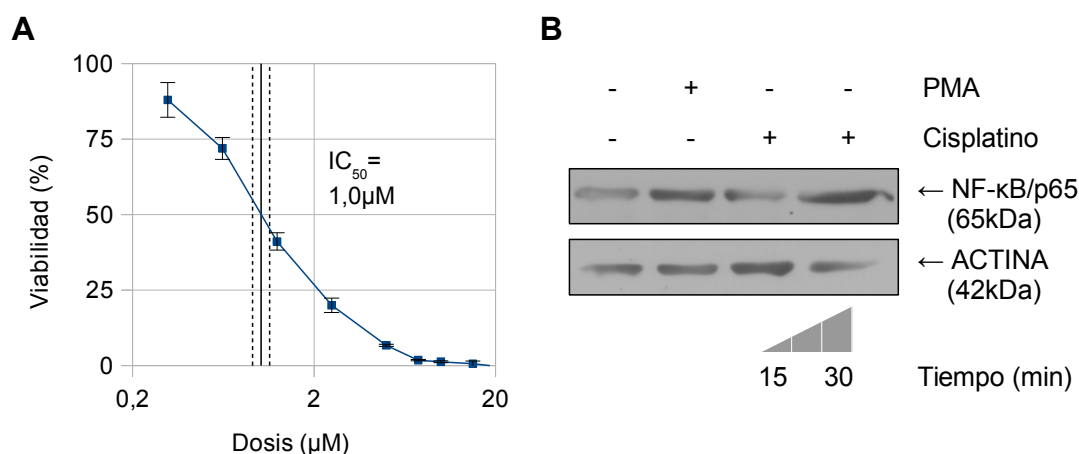


Figura 17: Efecto del cisplatino en la línea H125. Panel A: Curva de inhibición de la proliferación por cisplatino. Monocapas subconfluentes fueron tratadas con distintas dosis durante 72h y se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. Cada valor representa la media $\pm$ D.E. La línea vertical indica la dosis correspondiente a la IC_{50} y las líneas punteadas su intervalo de confianza. **Panel B:** Extractos nucleares preparados a partir de células H125 tratadas durante 15min con PMA o durante 15 y 30min con cisplatino se analizaron mediante WB para p65. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

Luego de constatar que el cisplatino aumentó los niveles nucleares de NF-κB en la línea H125, decidimos evaluar el efecto de su combinación con CIGB-300. Observamos nuevamente que el cisplatino, al igual que PMA, aumentó los niveles de p65 nuclear, mientras que con CIGB-300 disminuyeron. Ahora cuando combinamos CIGB-300 y cisplatino los niveles de p65 volvieron a disminuir, denotando que el efecto de CIGB-300 prevalece no sólo sobre el estímulo activador del PMA sino que también sobre el generado por el cisplatino (Figura 18).

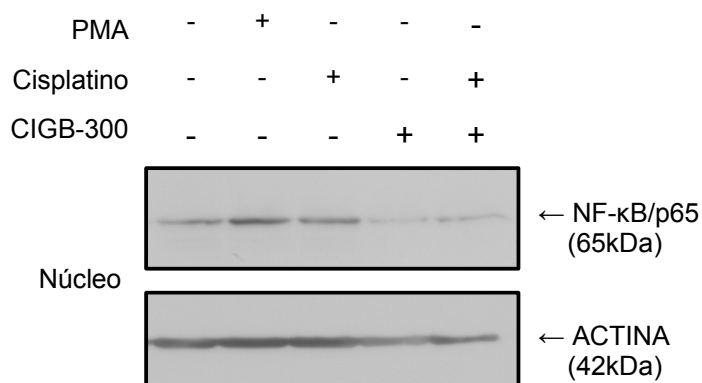


Figura 18: Efecto del cisplatino y CIGB-300 en la vía de NF-κB. Extractos nucleares preparados a partir de células H125 control, tratadas por 30min con PMA, cisplatino, CIGB-300 o la combinación de estos dos últimos, se analizaron por Western blot para p65. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

Este resultado nos alentó a evaluar la efectividad de CIGB-300 en un escenario de quimiorresistencia.

Generación de una línea NSCLC resistente a cisplatino

En función de los resultados obtenidos, nos propusimos generar *in vitro* un modelo de NSCLC que fuese resistente a la terapia con cisplatino a fin de estudiar el efecto de CIGB-300 en este modelo. Puesto que sepamos no existen antecedentes bibliográficos en los que se hayan generado modelos quimiorresistentes utilizando las células H125, decidimos hacerlo con otra que suele utilizarse con frecuencia para la obtención de los mismos: la línea humana A549. Esto a su vez nos permitiría extender nuestros hallazgos a otro modelo celular. A fin de conseguirlo, llevamos adelante dos esquemas de tratamiento diferentes.

El primer enfoque estuvo basado en el trabajo de Odii y colaboradores, en el cual obtuvieron una línea de carcinoma hepatocelular resistente a cisplatino en el transcurso de un mes, adaptando *in vitro* el régimen de tratamiento utilizado en pacientes⁹⁵. Para el caso de cáncer de pulmón, los pacientes con

Resultados

estadios IIA, IIB y IIIA reciben como adyuvancia a la cirugía 3 a 4 ciclos de cisplatino por semana, durante 3 a 4 semanas¹¹. Este esquema tiene la ventaja de ser corto y asemejarse al escenario clínico. El protocolo consistió en tratar a las células A549 3 veces por semana durante 4 semanas con la IC_{50} de cisplatino que determinamos previamente (Figura 19A), dejando entre cada semana un período de recuperación de la línea y repicándola de ser necesario. En paralelo se mantuvo a la línea A549 sin tratamiento. Transcurridas las 4 semanas se evaluó la IC_{50} para cisplatino de cada condición, pero no se observaron diferencias significativas, por lo cual este esquema fue descartado.

El segundo esquema de tratamiento ya había sido descrito para la línea A549 y tenía un tiempo de duración de 20 meses⁸⁰. A lo largo de todo el período las células se deben tratar por 72h con la IC_{50} , para luego repicarlas y dejarlas recuperarse el resto de la semana, repitiendo este esquema sucesivamente. En paralelo como control se mantiene a la línea sin ser tratada (A549 parental). Decidimos llevarlo adelante y evaluar si obteníamos una respuesta diferencial a cisplatino en un período menor (Figura 19B).

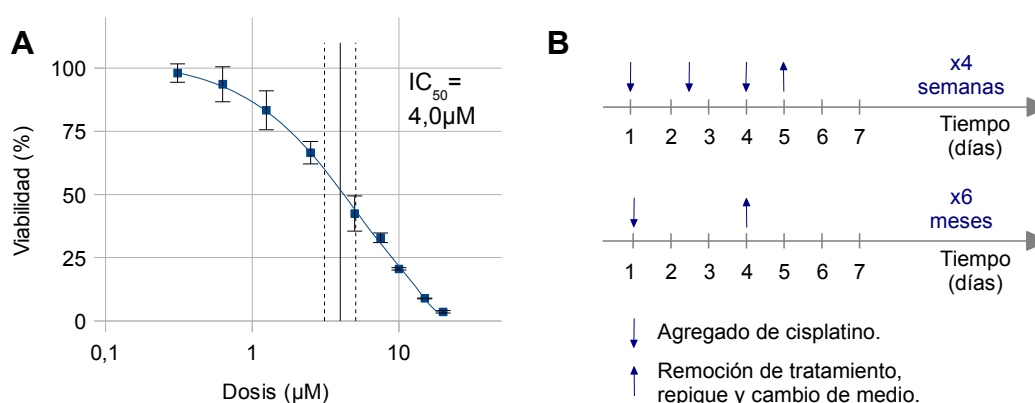


Figura 19: Protocolo para la obtención de la línea A549 resistente a cisplatino. Panel A: Curva de inhibición de la proliferación por cisplatino. Monocapas subconfluentes fueron tratadas con distintas dosis durante 72h y se midió la viabilidad celular por el método de MTS. Cada valor representa la media $\pm$ E.E. La línea vertical indica la dosis correspondiente a la IC_{50} y las líneas punteadas su intervalo de confianza. Panel B: se esquematizan los dos protocolos de

Resultados

tratamiento que se ensayaron para generar resistencia a cisplatino en la línea A549.

En nuestro caso mantuvimos una exposición crónica a cisplatino durante seis meses, lo que nos permitió generar la variante resistente A549-cispR. Como se observa en la Figura 20, la IC_{50} obtenida fue significativamente mayor que la de la línea parental. Consistentemente, la viabilidad de la nueva línea tras el tratamiento con $5,0\mu\text{M}$ de cisplatino fue dos veces mayor que la de la parental según pudimos constatar por recuento directo. Estas diferencias fueron sostenidas en el tiempo e incluso luego de dos rondas de congelación/descongelación de ambas líneas, confirmando la adquisición de resistencia al cisplatino.

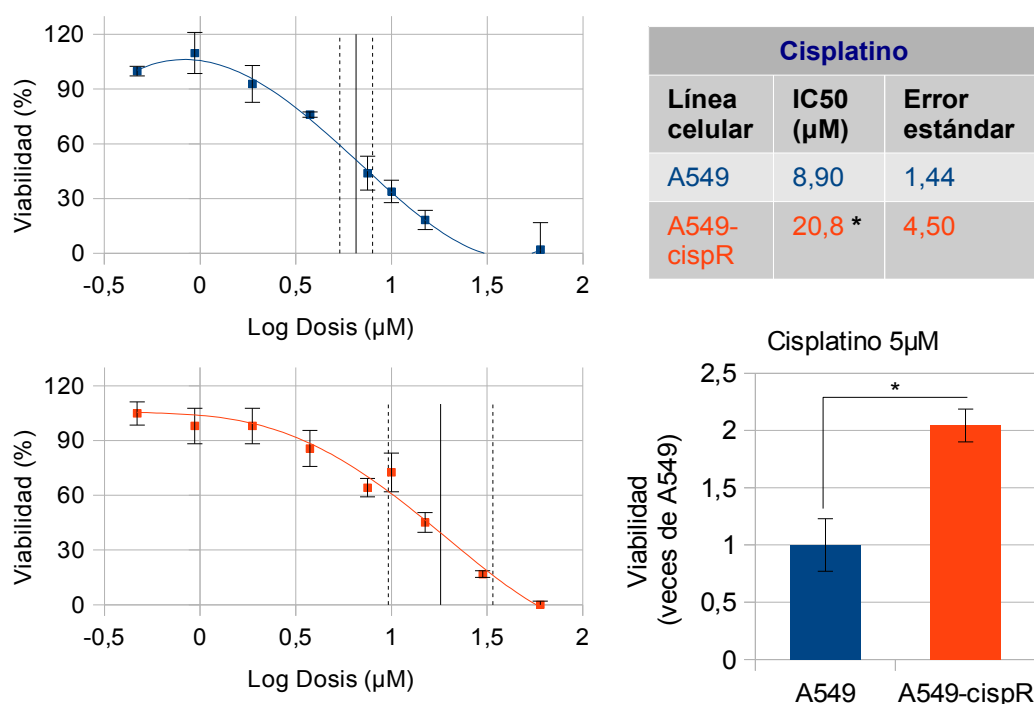


Figura 20: Línea A549 cisplatino resistente. Panel A: Curva de inhibición de la proliferación por cisplatino para las líneas A549 (arriba) y A549-cispR (abajo). Monocapas subconfluentes fueron tratadas con distintas dosis durante 72h y se midió la viabilidad celular por el método de MTS. La línea vertical indica la dosis correspondiente a la IC_{50} y las líneas punteadas su intervalo de

Resultados

confianza. La tabla muestra la media $\pm$ E.E. de la IC_{50} para cada línea, $*p<0,05$, test-T. Panel B: Recuento directo celular tras el tratamiento con $5\mu M$ de cisplatino en las líneas A549 y A59-cispR. La viabilidad se expresa en veces de la línea A549 parental. El gráfico muestra la media $\pm$ E.E. $*p<0,05$, test-T.

Seguidamente, exploramos en la nueva línea celular obtenida los niveles proteicos de NF- κ B/p65 y β -catenina. Si bien los niveles de β -catenina no variaron entre líneas, llamativamente la línea A549-cispR presentó menores niveles de expresión total de p65 que la A549 (Figura 21A). No obstante, cuando ambas líneas fueron tratadas con cisplatino por distintos tiempos, mostraron patrones diferentes de activación de NF- κ B. Mientras que en la línea parental los niveles nucleares de p65 descendieron luego del tratamiento, en la línea resistente los mismos aumentaron significativamente (Figura 21B). Podemos afirmar entonces que la línea A549 luego de ser expuesta crónicamente durante seis meses al cisplatino presentó bajos niveles totales de NF- κ B y comenzó a activar la vía en respuesta al tratamiento con el quimioterápico.

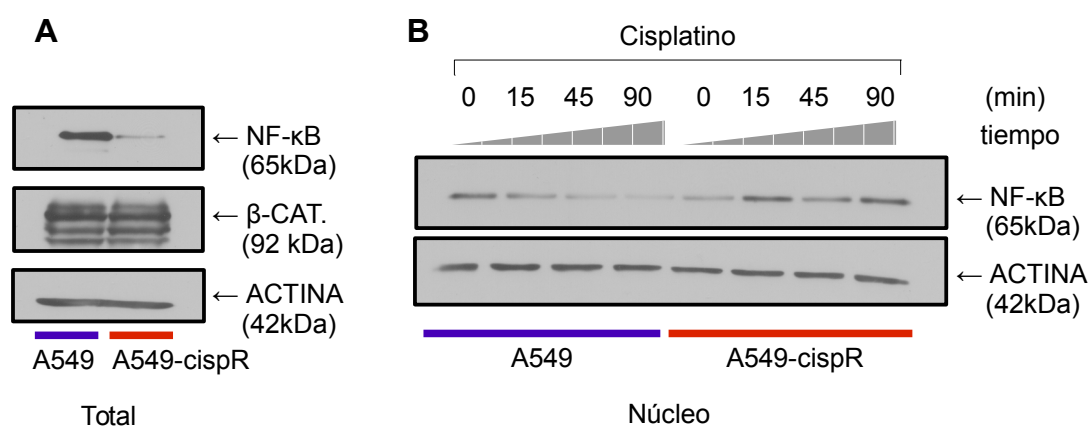


Figura 21: Vía de NF- κ B en la línea quimiorresistente. Panel A: Extractos totales preparados a partir de células A549 y A549-cispR se analizaron por Western Blot para NF- κ B/p65 y β -catenina (β -CAT.). Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga. **Panel B:** Extractos nucleares preparados a partir de células A549 y A549-cispR tratadas por 0, 15, 45 y 90min con cisplatino, se analizaron por Western blot para p65. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

Efecto de CIGB-300 en un contexto de quimiorresistencia.

El siguiente paso fue estudiar cómo respondía la línea NSCLC cisplatino-resistente al tratamiento con CIGB-300.

Comenzamos analizando la modulación de los niveles de p65 nuclear en las células A549 y A549-cispR luego del tratamiento por 90min con cisplatino, CIGB-300 o su combinación. El estímulo con PMA fue también usado como control. Observamos que el tratamiento con CIGB-300, sólo o en combinación con cisplatino, disminuyó los niveles nucleares de p65 en ambas líneas celulares (Figura 22A).

A fin de confirmar la inhibición de la vía de NF- κ B analizamos por WB los niveles de dos proteínas blanco, BAX y c-MYC, luego de 4h de tratamiento con CIGB-300. Vimos que la proteína pro-apoptótica BAX aumentó en ambas líneas en presencia de CIGB-300. En cambio, c-MYC disminuyó únicamente en la línea A549-cispR tras el tratamiento con CIGB-300 (Figura 22B), presentando una respuesta diferencial entre la línea parental y la cisplatino resistente.

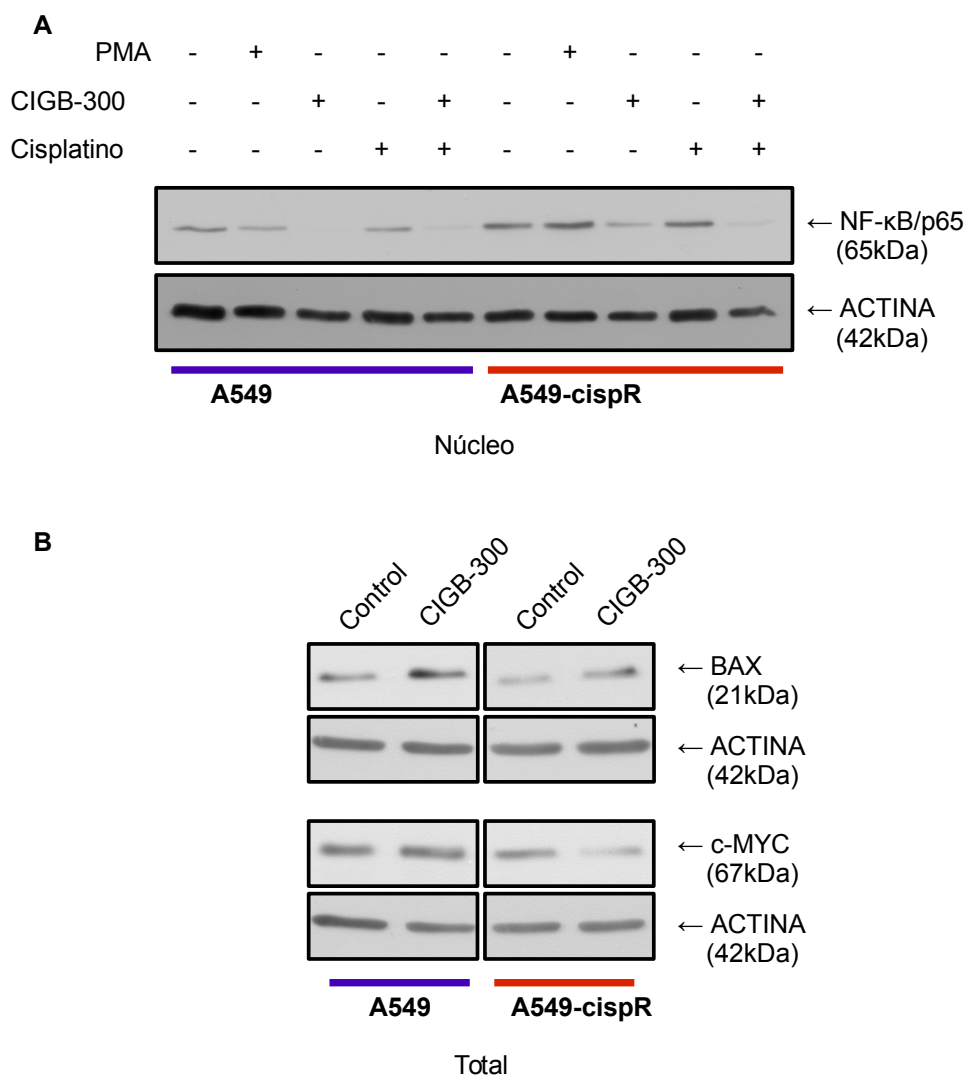


Figura 22: CIGB-300 en línea quimiorresistente, vía NF-κB. Panel A: Extractos nucleares preparados a partir de células A549 y A549-cispR control, tratadas por 90min con PMA, cisplatino, CIGB-300 o la combinación de estos dos últimos, se analizaron por Western Blot para p65. Panel B: Extractos totales preparados a partir de células A549 y A549-cispR control y tratadas con CIGB-300 por 4h se analizaron mediante WB para BAX y c-MYC. Los niveles proteicos de Actina fueron usados como control de carga.

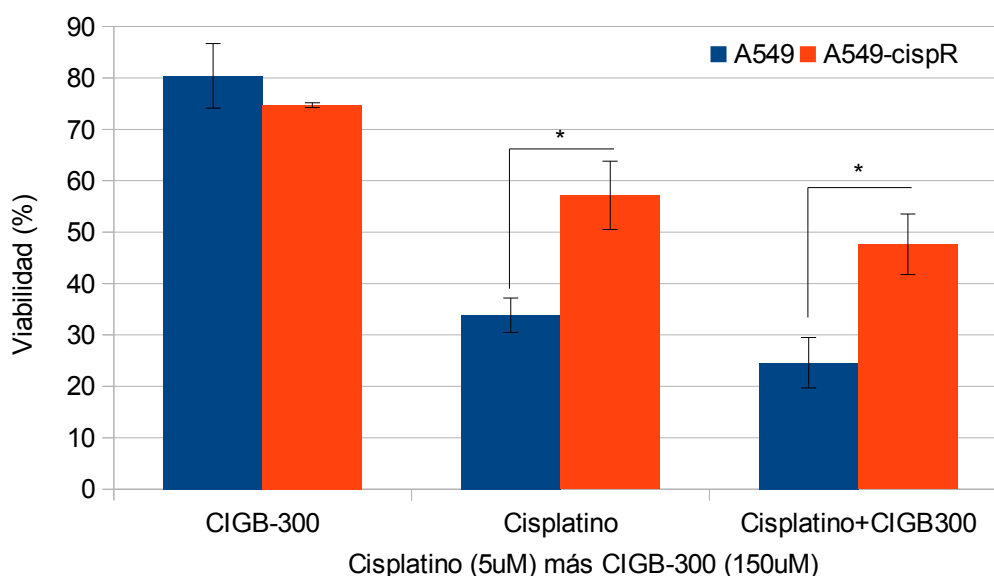
En conjunto estos resultados muestran que tanto en la línea parental como en la resistente CIGB-300 inhibió la vía de NF-κB, confirmando el efecto en un nuevo modelo. Más aún, el tratamiento disminuyó los niveles de c-MYC únicamente en la línea quimiorresistente. Dado el importante rol de esta

proteína en la progresión tumoral, su modulación por CIGB-300 podría causar un mayor efecto anti-proliferativo en esta línea.

El hecho de que la línea quimiorresistente active la vía de NF- κ B en respuesta al cisplatino, sumado a que CIGB-300 fue capaz de inhibirla (aún en presencia del quimioterápico) nos condujo a evaluar el efecto del co-tratamiento en la capacidad proliferativa de las líneas A549 y A549-cispR.

Comenzamos analizando si una dosis baja de CIGB-300 era capaz de incrementar la respuesta anti-proliferativa de cisplatino. Para ello tratamos durante 72h a las líneas celulares con CIGB-300 150 μ M, cisplatino 5 μ M o su combinación y evaluamos la viabilidad por recuento directo. En ambas líneas, observamos la tendencia hacia una mayor respuesta en la combinación respecto a los tratamientos por separado, aunque las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas (Figura 23).

Resultados



*Figura 23: Combinación de cisplatino y CIGB-300, capacidad proliferativa. El número de células se determinó mediante recuento directo tras el tratamiento con una dosis baja de CIGB-300, 5 μ M de cisplatino o su combinación, en las líneas A549 y A59-cispR. La viabilidad se expresa como porcentaje de la condición control (sin tratamiento) para cada línea celular. El gráfico muestra la media $\pm$ E.E. * $p < 0,05$, ANOVA.*

Con el fin de determinar el tipo de interacción entre ambas drogas, usamos el método de Chou y Talalay⁸¹. Tratamos a las líneas A549 y A549-cispR con cisplatino, CIGB-300 o ambas, utilizando diluciones seriadas por encima y por debajo del valor de IC₅₀ de cada droga (detallado en Materiales y métodos, Tabla 1). En la Figura 24A pueden observarse, para cada línea celular, las curvas dosis respuesta de las drogas por separado y de su combinación. Las dosis del co-tratamiento son la suma de las dosis de cada droga. La fracción afectada (Fa) equivale a cuan inhibida resultó la proliferación en ese punto. Para mayor claridad, los valores numéricos que conforman dicho gráfico pueden encontrarse como Anexo (Figura 1). Tanto los tratamientos como su combinación abarcaron un amplio espectro de Fa, hay entre 5 y 6 puntos de dosis evaluados y los ajustes empleados por el modelo son apropiados ($r > 0,95$ para todas las curvas). Habiendo cumplido con los requisitos mencionados, exigidos en el ensayo de Chou y Talalay, analizamos

la contribución de cada droga en el efecto combinatorio con respecto a su contribución individual, es decir, calculamos el índice de combinación (CI) correspondiente a cada punto evaluado. Cuando $CI < 1$, la combinación de esas dosis ejerce un efecto sinérgico en la proliferación con respecto a las dosis por separado.

El CI de cada punto evaluado, en función de la fracción afectada que le correspondió, se grafica en la Figura 24B. Como podemos observar, todos los CI se ubican por encima de 1 para todas las combinaciones estudiadas, que abarcaron el espectro completo de Fa. Es decir que ninguna de las dos líneas presentó un efecto aditivo o sinérgico a lo largo de todas las combinaciones estudiadas ($CI > 1$ para todos los casos).

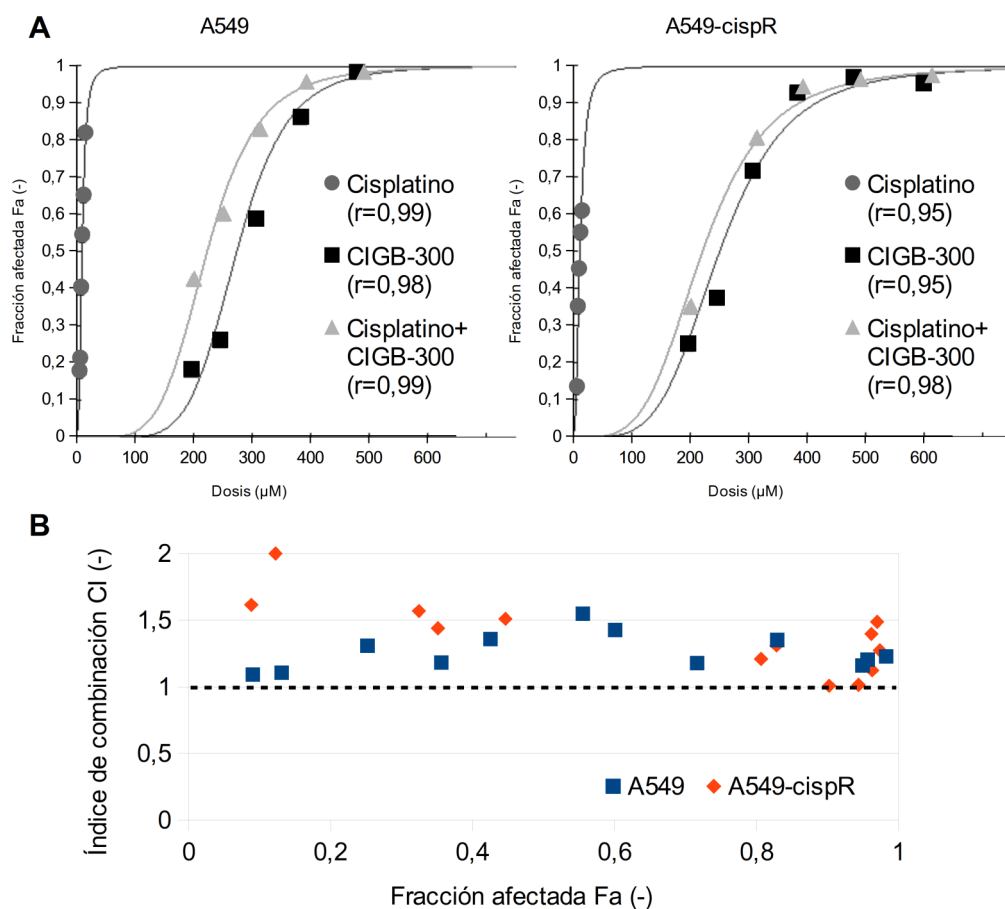


Figura 24: Ensayo de interacción de Cisplatino y CIGB-300. Panel A: curvas dosis-respuesta de las líneas A549 (izquierda) y A549-cispR (derecha) para Cisplatino (círculos), CIGB-300 (cuadrados) y su combinación (triángulos), obtenidas por MTS. La fracción afectada representa el nivel de inhibición de la proliferación de cada punto en función de la condición control. Se muestra el coeficiente de correlación (r) para cada tratamiento. Panel B: Gráfico del índice de combinación de Chou y Talalay (CI) en función de la fracción afectada Fa, para CIGB-300 y Cisplatino. Valores provenientes de tres experimentos independientes.

Al observar las curvas de inhibición, notamos que CIGB-300 afectaba más a la línea A549-cispR en casi todas las dosis estudiadas (Figura 24A). Decidimos entonces hacer un análisis más detallado. Cuando se ensayó una dosis alta de CIGB-300 (300 μM), se observó una mayor reducción de la

Resultados

viabilidad en la línea cisplatino resistente respecto a la parental (Figura 25A). La respuesta aumentada de estas células a CIGB-300 fue también corroborada por una reducción significativa en la IC_{50} (Figura 25B).

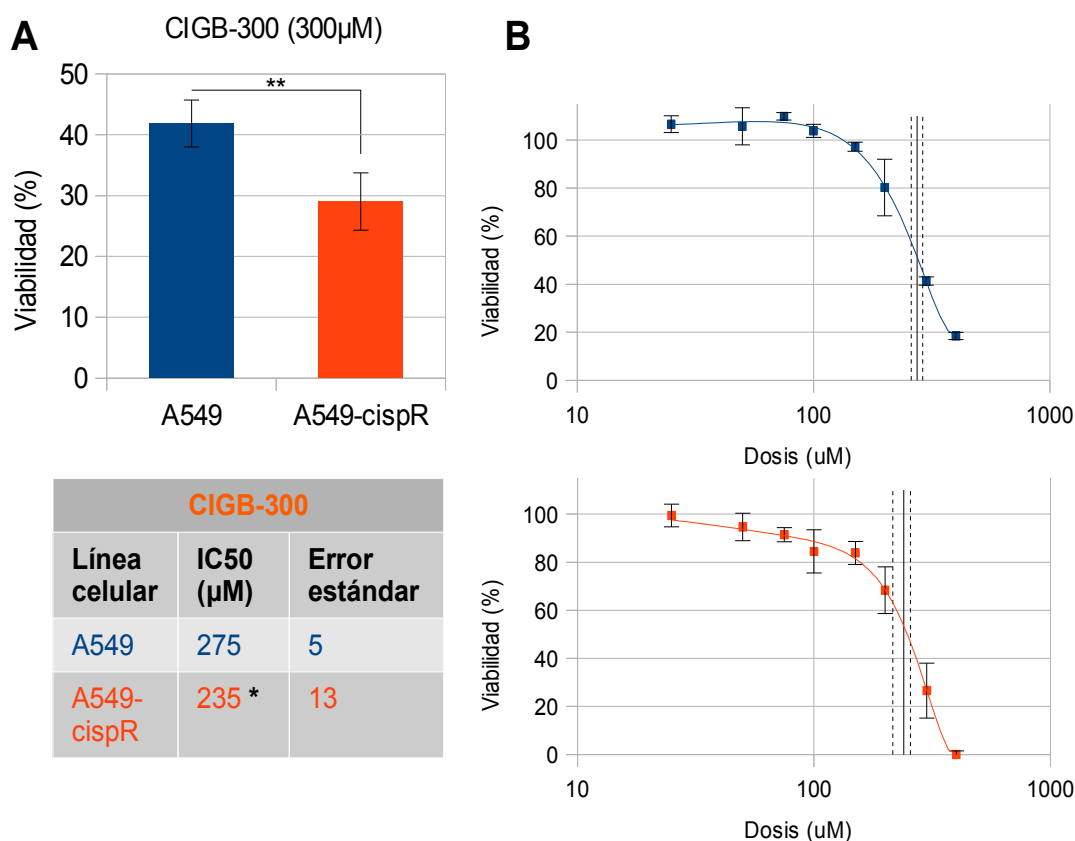
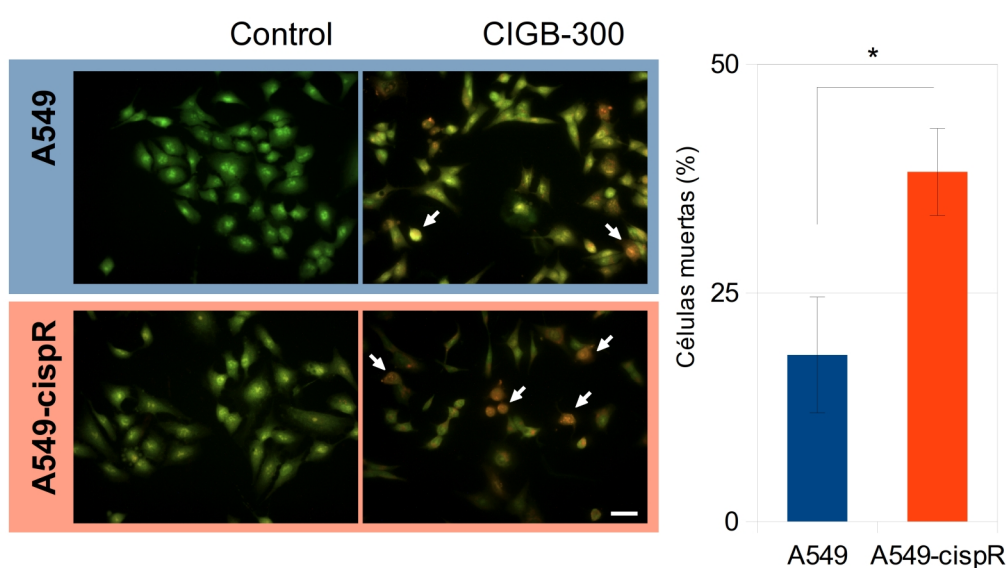


Figura 25: CIGB-300 en línea quimiorresistente. Panel A: Células A549 y A549-cisR fueron tratadas con una dosis alta de CIGB-300 (300 μ M) durante 72h y la viabilidad celular fue evaluada por el método de MTS. Los datos fueron expresados como la media $\pm$ E.E. ** $p < 0,01$ vs. la línea parental (test-T). Panel B: Curva de inhibición de la proliferación por CIGB-300 para las líneas A549 (arriba) y A549-cisR (abajo). Monocapas subconfluentes fueron tratadas con distintas dosis durante 72h y se midió la viabilidad celular por el método de MTS. La línea vertical indica la dosis correspondiente a la IC_{50} y las líneas punteadas su intervalo de confianza. La tabla muestra la media $\pm$ E.E. de la IC_{50} para cada línea, * $p < 0,05$, test-T.

A fin de estudiar la inducción de muerte celular y los posibles mecanismos en las líneas A549 y A549-cisR, se llevó a cabo una tinción con Naranja de Acridina / Bromuro de Etidio. Luego del tratamiento con CIGB-300, ambas

Resultados

líneas celulares presentaron células en apoptosis temprana y tardía, junto con células necróticas en menor proporción. La cantidad de células muertas por el tratamiento resultó significativamente mayor en la línea cisplatino resistente respecto de la parental (Figura 26), confirmando la respuesta diferencial a CIGB-300 observada previamente.



*Figura 26: Inducción de muerte celular por CIGB-300 en línea quimiorresistente. Células A549 y A549-cisR fueron tratadas con una alta dosis de CIGB-300 (300 μ M) durante 18h y coloreadas con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio. El número de células apoptóticas y necróticas según el patrón de tinción fue cuantificado y expresado como porcentaje del número total de células para cada línea. Los datos se expresan como la media $\pm$ E.E. * $p < 0,05$, test-T.*

En función de este resultado y los anteriores, concluimos que la adquisición de resistencia a cisplatino en la línea A549 conlleva a la sensibilización al tratamiento con CIGB-300.

Discusión

Sesenta mil personas morirán a causa del cáncer este año en nuestro país. El 15% son pacientes con cáncer de pulmón^a. En el escenario más probable, habrán podido convivir algunos años con la enfermedad atravesando una resección quirúrgica acompañada de radio- y/o quimioterapia. Los recientes avances en inmunoterapia prometen mejorar estas condiciones, aunque por el momento su alcance está limitado a un subgrupo particular de pacientes. Aún así, esta es una evidencia más de que las nuevas terapias moleculares sean probablemente las que revertirán el actual escenario de esta patología. He aquí la necesidad de continuar con esta búsqueda.

La proteína quinasa CK2 aparece como un atractivo blanco terapéutico debido a la regulación atípica que ejerce sobre diversas vías de señalización con amplia relevancia en cáncer. Asimismo, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana encaró la búsqueda de un inhibidor de su actividad con un enfoque racional innovador: el bloqueo del sitio de fosforilación de la enzima sobre los sustratos. Un mecanismo de acción indirecto, sobre un regulador global: más de 350 proteínas blanco de fosforilación por CK2 en la célula, sobre las que CIGB-300 podría estar actuando. En el presente trabajo de tesis nos hemos propuesto, en base a la evidencia ya existente, analizar el rol terapéutico de CIGB-300 en un modelo preclínico de NSCLC, abordando el estudio a través de tres ejes que discutiremos a continuación: la progresión maligna, las vías de señalización y el aporte a la terapia convencional.

En primera instancia hemos corroborado que CIGB-300 ejerce un importante efecto anti-proliferativo de manera dosis-dependiente sobre tres líneas diferentes de NSCLC, en un rango de 120-280µM ubicándose las células H125 y 3LL sobre el límite inferior y las A549 sobre el superior (Cap. I, Figura 1). Teniendo en cuenta que drogas convencionales como las moléculas

a) Datos del Ministerio de Salud obtenidos de <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/mortalidad/> (2016)

pequeñas suelen usarse en concentraciones dos órdenes de magnitud menores, estas dosis podrían parecer elevadas. Sin embargo hay que considerar la naturaleza peptídica de CIGB-300, conformada íntegramente por aminoácidos naturales de alta tolerancia. En este sentido es frecuente encontrar en la bibliografía péptidos con propiedades antitumorales en dosis del orden utilizado en este estudio. Por ejemplo, analizando una base de datos de 1000 péptidos validados *in vitro* en distintas líneas celulares tumorales, cerca de un tercio poseen una IC_{50} por encima de $50\mu M$ y de éstos aproximadamente un 7% son mayores a $100\mu M$ (tabla 1)⁹⁶.

Tabla 1: Valores de IC_{50} obtenidos por MTT para diversas drogas peptídicas en líneas celulares tumorales.

<i>Rango de IC_{50}</i>	<i>Cantidad de péptidos hallados</i>
Entre 0 y $50\mu M$	677
Entre 50 y $100\mu M$	239
Mayor a $100\mu M$	68
Total	984

Cabe también mencionar que CIGB-300 posee un buen índice terapéutico, ya que se requieren dosis de al menos el doble de las usadas en líneas tumorales para inhibir la proliferación de células no tumorales⁸⁴. Además, las dosis empleadas en este trabajo, incluso las más altas, son clínicamente relevantes, ya que se encuentran por debajo de las que han sido usadas y bien toleradas en otros ensayos *in vivo*: dosis de 40mg/kg/día administradas de forma sistémica resultaron seguras y no tóxicas, con valores de biodistribución por encima del 1,5% de captación del péptido en el sitio del tumor 24h pos inyección⁹⁷. Además, el tratamiento durante 5 días con esta dosis redujo el crecimiento tumoral en ratones *nude* inyectados de forma subcutánea con células H125, en línea con los resultados obtenidos *in vitro* en relación a la proliferación celular.

Dosis bajas de CIGB-300 probaron también ser capaces de alterar otros parámetros asociados con la progresión maligna en las líneas 3LL y H125. La

motilidad celular disminuyó notablemente en ambas líneas luego de ser tratadas con la IC₂₅ para CIGB-300. En consonancia con estos hallazgos, la actividad proteolítica secretada (MMP-2 y uPA) se vio fuertemente reducida por el tratamiento con dosis aún más bajas de CIGB-300. Dichas dosis fueron seleccionadas a fin de garantizar que no se induzca muerte celular en un contexto necesario para condicionar el medio de cultivo, en el que se combina el tratamiento con la ausencia de SFB durante 24h (Cap. I, Figura 6). En conjunto estos resultados denotan la capacidad de CIGB-300 de alterar procesos claves en la progresión y la diseminación metastásica, y se encuentran en concordancia con hallazgos recientes que demuestran la reducción de la colonización pulmonar *in vivo*⁹⁸. En este sentido, Benavent y colaboradores demostraron que la administración sistémica de CIGB-300 redujo el número de lesiones pulmonares macroscópicas, originadas por la inyección de células 3LL a través de la vena de la cola en ratones C57BL/6. Adicionalmente, la formación de metástasis espontáneas producto de la inyección subcutánea de la misma línea también se redujo con el tratamiento.

En las líneas A549 y H125, demostramos la inducción de muerte celular causada por CIGB-300 predominantemente por apoptosis. Como ejemplo, en la línea H125, con tan sólo una hora de tratamiento con la IC₅₀ de CIGB-300, se observó inducción de muerte en un 30% de la población (el etopósido, un inductor de apoptosis ampliamente caracterizado produjo un efecto similar luego de 24h) (Cap. I, Figura 2). En la línea A549 realizamos tratamientos de 18h con la IC₅₀ de CIGB-300 a fin de contrastar la inducción de muerte en esta línea con la de su variante quimiorresistente (esta comparación es discutida más adelante). Constatamos también en este modelo la muerte celular por visualización directa de células apóptóticas y necróticas (Cap. III, Figura 26). Resultados similares fueron obtenidos *in vivo* por nuestro grupo colaborador del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, quienes pudieron evidenciar la inducción de apoptosis luego del tratamiento sistémico por 5 días en tumores de ratones C57/BL6 originados por la inoculación de otra línea murina de cáncer de pulmón⁹⁷. Estos hallazgos se condicen con los reportados

previamente para otras líneas tumorales⁶⁴ y con la rápida internalización del péptido descrita en cultivos 2D⁶⁸. Aquí, la naturaleza peptídica, sumado a la presencia del péptido de internalización TAT⁷⁴ le confieren a CIGB-300 notables ventajas para ingresar rápidamente en la célula y ejercer su efecto antitumoral. Seguidamente, ampliamos nuestro estudio sobre los efectos relacionados a la progresión tumoral a cultivos 3D, con el fin de desafiar las propiedades del péptido en un escenario más complejo y similar al de un tumor avascular *in vivo*.

Pudimos generar con éxito un modelo de esferoides tumorales con la línea H125 a partir de 1000 células iniciales, que fueron capaces de crecer sostenidamente en el tiempo manteniendo su compactación y forma. Si bien estos esferoides resultaron de menor tamaño que los que se pueden obtener en otras líneas celulares, luego de una semana de crecimiento los mismos presentaron un centro necrótico y nos permitieron llevar a cabo los ensayos estipulados. No fue posible desarrollar esferoides con un número mayor de células iniciales puesto que no se mantenían a lo largo del tiempo (Cap. I, Figura 3). CIGB-300 indujo una marcada inhibición en el crecimiento de los esferoides luego de 5 días de tratamiento a la misma dosis que resultó efectiva para los cultivos en monocapa (Cap. I, Figura 4). Es interesante destacar que un gran número de agentes terapéuticos presentan menor inhibición del crecimiento sobre cultivos de agregados multicelulares, y que por esta razón se requiere un aumento significativo en la dosis de uso para generar un efecto^{99,100}. Entre los factores responsables de esta diferencia en la respuesta, podemos mencionar la capacidad de penetración de la droga, así como también la activación de distintas señales de supervivencia determinadas por las interacciones célula-célula, tales como PI3K/Akt, NF-κB y Stat3¹⁰¹. Doublier y colaboradores han demostrado que esferoides derivados de células de cáncer de mama resultaron menos sensibles a la doxorrubicina y presentaron menor captación de la droga que los cultivos en monocapa¹⁰². Más aún, Fayad y colaboradores hallaron que el cisplatino sólo afecta 30µm de la periferia en cultivos tridimensionales de un carcinoma, incluso en presencia de altas dosis y

luego de 96h de tratamiento¹⁰³. Por el contrario, CIGB-300 presentó una rápida penetración en el término de minutos sobre esferoides compactos de más de 200µm de diámetro, alcanzando su centro en menos de una hora (Cap. I, Figura 5). Por lo tanto, demostramos que CIGB-300 es efectivo tanto en cultivos 2D como 3D para NSCLC.

De acuerdo a nuestro conocimiento, es la primera vez que se estudia el efecto de CIGB-300 sobre vías de señalización vinculadas a CK2 en cáncer de pulmón, extendiendo de esta manera los hallazgos acerca de su mecanismo de acción⁶⁴. Previamente Martins y colaboradores reportaron que CIGB-300 era capaz de interrumpir la señalización del eje PI3K/AKT/GSK3, alterando la proliferación e induciendo apoptosis en modelos de leucemia linfocítica crónica⁶⁹. Nosotros ampliamos este conocimiento a otros dos ejes a través de los cuales CK2 ejerce su regulación, sumamente relevantes en la progresión del cáncer de pulmón: las vías de Wnt/β-catenina y NF-κB (Introducción, Figura 6).

Comenzamos estudiando la vía de Wnt, para lo cual aprovechamos el medio condicionado obtenido a partir de células L (fibroblastos de ratón) que sobreexpresan el factor wnt3a. La incubación de las células H125 en presencia del factor wnt3a produjo la acumulación citoplasmática de β-catenina, validando la funcionalidad del sistema (descartamos mediante controles específicos que la activación fuera producto de otros factores presentes en el MC) (Cap. II, Figura 7B). En condiciones de previa estimulación de la vía, CIGB-300 y la inhibición clásica de CK2 por TBB redujeron parcialmente los niveles de β-catenina citoplasmática, sugiriendo que ambos tratamientos modulan esta vía. Sin embargo, tanto CIGB-300 como TBB no afectaron los niveles citoplasmáticos basales de β-catenina (Cap. II, Figura 7C). Este resultado indicaría que el efecto anti-proliferativo observado en la línea H125 no se asocia a la vía canónica de Wnt en estas condiciones. Licchesi y colaboradores observaron que la línea H125 presenta niveles basales indetectables de β-catenina activa (no fosforilada)¹⁰⁴. Por ende, bajos niveles

basales de β -catenina en estas células estarían explicando la ausencia de modulación observada. Entonces, los niveles de β -catenina serían modulables por CIGB-300 en forma condicional luego de la activación de la vía con un ligando como el factor wnt3a. Otro reporte que estudia el bloqueo de TBB sobre el reclutamiento de β -catenina a sus genes blanco también requirió la previa estimulación de la vía con LiCl³⁶. Por lo tanto el efecto de CIGB-300 sobre la vía de Wnt podría resultar relevante en células tumorales con altos niveles constitutivos de β -catenina causados por estímulos constitutivos o transitorios del microambiente tumoral³³.

El análisis de la vía canónica de NF- κ B resultó ser sumamente relevante. En una primera instancia el esquema de tratamiento que había dado resultado para analizar la vía de Wnt no tuvo efecto en esta segunda vía. El tratamiento por 6h con CIGB-300 no produjo ningún cambio en los niveles nucleares de p65/NF- κ B, como tampoco fue capaz de alterar la activación en el Elemento de Respuesta a NF- κ B luego de su estimulación (Cap. II, Figura 8). De todas maneras, estos resultados nos permitieron constatar la activación sostenida de la vía por el tratamiento con PMA, y advertir que su efecto luego de 24h de tratamiento no se detectaba por WB en los niveles de p65 nuclear.

Hoffman y colaboradores estudiaron cómo se regulaba temporalmente la activación de NF- κ B en células normales y observaron en ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) que frente a la estimulación prolongada con TNF- α , los niveles nucleares de p65 aumentaban drásticamente los primeros 60min, para luego comenzar a oscilar hasta estabilizarse en las horas siguientes¹⁰⁵. Resultados similares se obtuvieron en líneas tumorales mediante microscopía de fluorescencia de célula única¹⁰⁶. Esto nos llevó, luego de una comunicación personal con la Dra. Mónica Costas, a reformular el esquema de tratamiento y a estudiar el efecto sobre la vía a tiempos cortos para posibilitar la visualización de cambios de los niveles de p65 en el núcleo. Así, tratamientos menores a una hora nos permitieron observar por WB el aumento de p65 nuclear por parte del estímulo PMA. Más aún, luego del tratamiento con CIGB-

300 verificamos que los niveles nucleares de RelA/p65 fueron amplia y significativamente reducidos en todas las líneas celulares de cáncer de pulmón analizadas (Cap. II, Figura 10 y Cap. III, Figura 22). Constatamos además, en la línea H125, un aumento concomitante de los niveles citoplasmáticos de p65 en presencia de tratamiento. Los niveles proteicos totales se mantuvieron constantes en todas las condiciones, indicando que la modulación observada era efectivamente producto de cambios particulares en cada compartimento subcelular. El efecto inhibitorio producido por CIGB-300 sobre los niveles de p65 nuclear se mantuvo incluso en presencia de PMA, indicando que prevalece incluso en un contexto de activación.

Resultados similares se obtuvieron por ensayos de inmunofluorescencia. En este caso el efecto más notorio se observó en presencia de PMA. El fuerte aumento en la intensidad de p65 nuclear producida por este tratamiento en un amplio número de células fue significativamente reducido en presencia de CIGB-300 (Cap. II, Figura 11). A su vez, la intensidad nuclear basal de p65 disminuyó con el tratamiento, confirmando los resultados obtenidos por WB.

El efecto de CIGB-300 en la vía de NF- κ B fue sostenido en el tiempo e impactó sobre la actividad transcripcional de su elemento de respuesta, según constatamos por ensayo de genes reporteros. CIGB-300 bloqueó el aumento en la actividad transcripcional ocasionada por PMA (Cap. II, Figura 12). Al igual que en el primer experimento de genes reporteros (Cap. II, Figura 8), no se observó ningún efecto sobre la actividad basal del NF- κ B-RE con el tratamiento de CIGB-300. Esto puede deberse a que el tratamiento fue insuficiente para revertir la transcripción basal previa del gen de luciferasa y por eso sólo detectamos el efecto cuando el activador PMA y CIGB-300 se utilizaron en combinación (cabe recordar que el tratamiento secuencial con PMA seguido de CIGB-300 tampoco mostró cambios).

Otra fuerte evidencia del efecto en la vía a largo plazo fue la modulación de varias proteínas blanco de NF- κ B en las distintas líneas celulares analizadas. Los niveles de las Ciclinas D1 y E (H125) y de c-MYC (A549-cispR)

disminuyeron, mientras que BAX (factor pro-apoptótico) aumentó luego del tratamiento prolongado con CIGB-300 (Cap. II, Figura 12 y Cap. III, Figura 22). La inducción de apoptosis observada podría explicarse en parte por la inhibición de NF- κ B y consecuente aumento en los niveles de BAX, complementando otras observaciones reportadas acerca de la activación de caspasas luego del tratamiento con CIGB-300⁶³.

Además, hemos verificado en nuestro modelo que CIGB-300 bloqueó la fosforilación inducida por TNF- α en la Ser529 de p65 (Cap. II, Figura 13). Este resultado es una fuerte evidencia acerca de la disrupción que estaría ejerciendo el péptido sobre un blanco de fosforilación específico de CK2 en la vía de NF- κ B. En concordancia con nuestros hallazgos, reportes recientes han descrito que el inhibidor de CK2, CX-4945, interrumpió la actividad del promotor blanco de NF- κ B en líneas de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello¹⁰⁷ y redujo los niveles de fosforilación de p65 en Ser529 en células de mieloma múltiple aisladas de pacientes¹⁰⁸. Estos estudios también destacan a p65 como uno de los principales blancos de inhibidores de CK2.

Adicionalmente, la relevancia de la activación de NF- κ B en la metástasis de cáncer de pulmón ha sido bien descrita en la bibliografía^{109,110}. En este sentido, la reducción por CIGB-300 de la motilidad celular y la secreción de enzimas proteolíticas podría estar relacionada a la inhibición de NF- κ B. Diversas enzimas proteolíticas (entre las que se encuentra la MMP-2) son blanco transcripcional de NF- κ B, con lo cual la inhibición de la vía podría estar afectando su expresión y por ende su actividad. Resultados similares a los aquí presentados han sido reportados en líneas humanas de cáncer de mama con otros compuestos que inhiben la vía de NF- κ B e inducen la reducción de la actividad de MMP-2 y uPA, alterando además la motilidad celular¹¹¹. La asociación entre la capacidad migratoria de células tumorales y la modulación de NF- κ B también ha sido reportada previamente en otros trabajos^{112,113}.

En conjunto, la disminución en los niveles nucleares de p65 y la modulación en las proteínas blanco hallada en todas las líneas analizadas,

junto con el bloqueo de la actividad dependiente del NF- κ B-RE y de la fosforilación activante en p65 por CK2, nos permiten afirmar que el tratamiento con CIGB-300 inhibió la vía canónica de NF- κ B en NSCLC.

El complejo de degradación del proteasoma se ha vuelto relevante en los últimos años como un promisorio blanco terapéutico, a partir del éxito clínico del Bortezomib¹¹⁴. En este trabajo, proponemos un nuevo blanco de CIGB-300, el sustrato de CK2 y miembro del núcleo proteolítico 20S del proteasoma: la subunidad PSMA3 (originalmente identificada como α 7/C8). Nos basamos en la ubicación coincidente de CIGB-300 con α 7/C8 y en el aumento de la actividad del proteasoma observada luego del tratamiento.

Puesto que la especificidad del complejo del proteasoma es tal que la degradación de sustratos particulares puede ser exacerbada sin afectar la proteólisis de otros, queda de manifiesto que el aumento observado en la actividad proteolítica del complejo debe ser consecuencia de la alteración en su mecanismo general y no de la mera exposición de la célula a un péptido foráneo, que podría estar siendo sustrato del proteasoma. En este sentido hay que tener en cuenta además que el principal mecanismo de degradación de CIGB-300 es el lisosoma⁶⁸.

La abundancia del péptido en el citoplasma celular fue mayor que la de la proteína α 7/C8. Esto es coherente al considerar la ubiquidad de blancos reportados para CIGB-300 y por ende de su localización. Aun así, prácticamente la totalidad de α 7/C8 co-localizó con CIGB-300, hecho que quedó evidenciado al medir el Coeficiente de Manders para la fracción de la subunidad en los sitios que presentaban marca del péptido (Cap. II, Figura 14). Paralelamente, CIGB-300 provocó un aumento de más de dos veces en la actividad del proteasoma luego de 30min de tratamiento, según pudimos constatar midiendo la degradación de un sustrato modelo (Cap. II, Figura 15).

Resultados previos del grupo del Dr. Perea (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología) mostraron además que la proteína α 7/C8 co-precipita con el péptido en ensayos de *pull-down* (comunicación personal aun

no publicada). La modulación de la maquinaria del proteasoma generada por otros péptidos análogos también fue descrita por Zanin y colaboradores¹¹⁵, aunque en este caso se reportó una inhibición de la actividad degradativa.

Bose y colaboradores reportaron el sustancial efecto estabilizador sobre la subunidad 26S que tiene la fosforilación de C8 por CK2¹¹⁶. Nosotros postulamos que la unión de CIGB-300 a $\alpha 7$ /C8 estaría incrementando su estabilidad y en consecuencia la actividad del complejo. Desafortunadamente por dificultades técnicas, no tuvimos éxito en detectar la fosforilación específica de C8 por CK2 (Ser243).

El hecho de que la activación del proteasoma es necesaria para la disminución de los niveles nucleares de p65 (Cap. II, Figura 16) es un interesante vínculo entre ambos procesos que podría explicar la inhibición observada en la vía de NF- κ B: un proteasoma más activo como consecuencia de la interacción con CIGB-300 que incrementa la degradación de p65.

En las condiciones estudiadas no observamos que el Bortezomib redujera *per se* los niveles nucleares de p65, poniendo de manifiesto que su efecto sobre la vía de NF- κ B podría ser dependiente del modelo, como ya han reportado otros autores⁵¹.

Vilchez y colaboradores demostraron que el incremento en la cantidad de proteasomas 26S ensamblados redundaba en un aumento de la actividad degradativa del complejo. Más aún, vieron que esto era causado por una mayor expresión de una de sus subunidades, en este caso PSMD11¹¹⁷. En línea con estos hallazgos, resulta muy interesante el resultado que hemos obtenido mediante un análisis *in silico*¹¹⁸ en referencia a la expresión de la subunidad PSMA3 y la supervivencia global (OS) en pacientes con cáncer de pulmón. A partir de un estudio multivariado, teniendo en cuenta el estadio y el historial de tabaquismo, se asoció la alta expresión de PSMA3 junto a la baja de p65 con una mayor supervivencia a 10 años ($p=0,0152$; HR 1,45 [1,07 – 1,95]). El análisis de ambas moléculas por separado presentó la misma tendencia que el análisis combinado, pero con una significancia *borderline*, sugiriendo que

contribuyen mutuamente (Anexo, Figura 2). El número de pacientes incluidos en el estudio fue mayor a 500 y representa una cifra robusta que genera resultados altamente confiables. Este hallazgo constituye un primer acercamiento a la utilidad de una terapia basada en el bloqueo de p65 mediante la estabilización y el aumento de la actividad del proteasoma. De todas maneras hay que ser cauto, ya que los niveles expresión de p65 no necesariamente son indicativos de actividad de la vía. Sería mucho más certero realizar un análisis de este tipo mediante inmunohistoquímica evaluando los niveles nucleares de p65, de la manera en que lo llevaron a cabo Kaiser y colaboradores sobre muestras de pacientes con cáncer de próstata. En dicho estudio evaluaron el vínculo entre p65 y CK2, y su relevancia en estos tumores. Hallaron que el análisis combinado de la presencia nuclear de p65 y CK2 α correlacionó con el estadio de la enfermedad, dejando de manifiesto la relación entre ambas moléculas y la progresión maligna en este tipo de tumores¹¹⁹.

Hasta el momento desconocemos de qué manera la interacción observada en el citoplasma entre $\alpha 7/C8$ y CIGB-300 tiene su consecuencia en el compartimento nuclear. Es posible que esta subunidad sea importada al núcleo luego de interaccionar con el péptido (o incluso en simultaneo) o por el contrario la interacción entre ambos está ocurriendo también en el núcleo. A diferencia de NF- κ B, los niveles de I κ B- α no se vieron afectados por el tratamiento. Este fenómeno podría ser consecuencia de diferentes mecanismos de degradación que podrían sufrir ambas moléculas. Si bien la degradación de I κ B- α es dependiente de ubiquitinación, la degradación de p65 podría ser regulada por un mecanismo diferente, como el que han reportado Hochrainer y colaboradores⁶¹. El aumento en los niveles citoplasmáticos de p65 en la línea H125 no se explicaría por la unión a su inhibidor, ni tampoco por el proteasoma, puesto que este mecanismo sólo concierne a p65 en el núcleo. La fosforilación por CK2 sobre p65 tampoco está asociada con los niveles citoplasmáticos/nucleares, sino con la fuerza de p65 como factor de transcripción. Por lo tanto, otros intermediarios de la vía no estudiados podrían ser los responsables.

En el esquema de la Figura 1 proponemos un modelo del mecanismo de regulación de los niveles nucleares de p65 hasta aquí discutido.

Se ha descripto previamente que CIGB-300 co-localiza en el nucleolo con nucleofosmina/B23 e inhibe su fosforilación, aboliendo de esta manera la biogénesis ribosomal y resultando en la rápida inducción de apoptosis de una fracción de las células de NSCLC⁶⁴. La presencia de CIGB-300 nuclear observada en un tercio de la población celular, y una fracción similar hallada de células apoptóticas, es consistente con esta descripción. Nuestros resultados extienden el mecanismo de acción presente y sugieren que la inhibición de las vías de supervivencia podrían ser las razones de los efectos anti-proliferativos observados a tiempos más largos. Como ya se mencionó antes, la sola inhibición de la vía de NF- κ B en muchos casos no es suficiente para inducir la muerte celular, y la estrategia terapéutica de inhibirla suele estar asociada a sensibilizar a las células tumorales frente a un segundo agente. En este contexto es posible también que la inhibición de CIGB-300 por la vía potencie otros efectos pro-apoptóticos mismos del tratamiento, generados por el bloqueo de la actividad pleiotrópica de CK2.

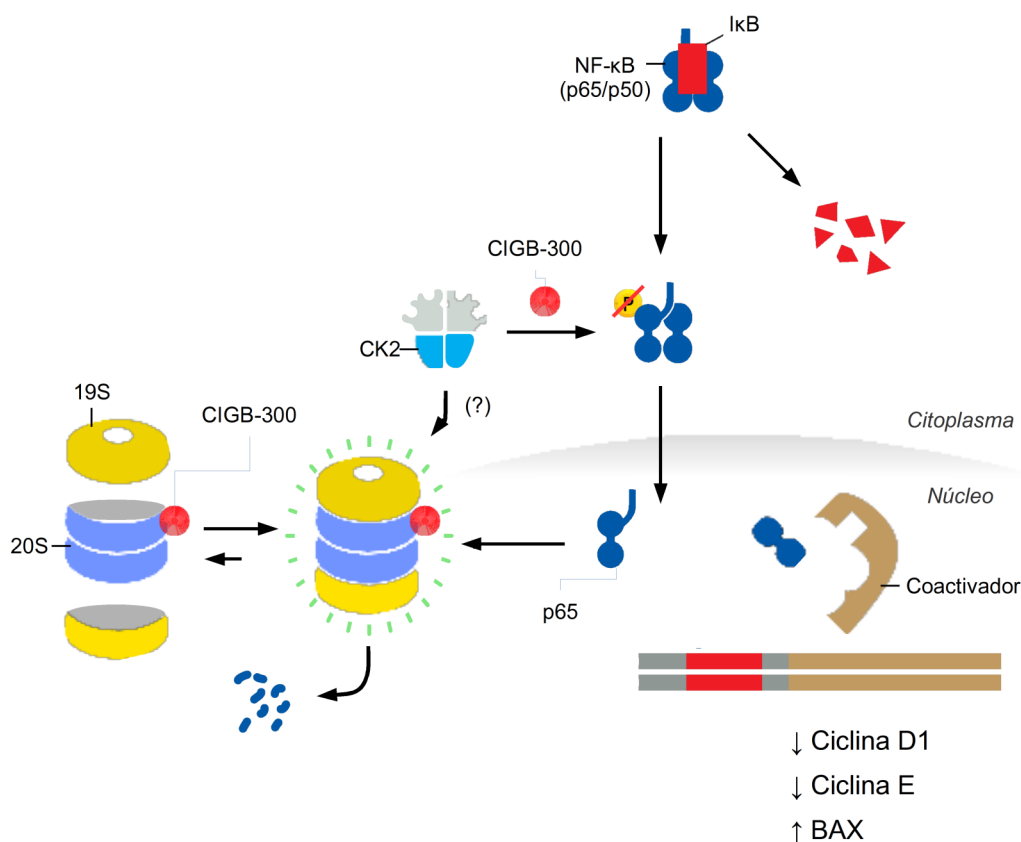


Figura 1: Modelo propuesto para el mecanismo de inhibición de NF-κB. El péptido CIGB-300 interacciona con α7/C8 del complejo 20S del proteasoma, provocando su estabilización. El aumento en la actividad del proteasoma redunda en un mecanismo de atenuación exacerbado de la vía, evitando la unión del factor de transcripción a los sitios promotores de sus proteínas blanco. CIGB-300 también interrumpe la fosforilación en p65 por CK2, lo que disminuye su estabilidad.

Los tumores refractarios a la terapia con cisplatino siguen siendo uno de los mayores desafíos en el tratamiento del NSCLC. Nuevas terapias de segunda línea son necesarias a fin de mejorar la respuesta de los pacientes. Se ha ampliado mucho el conocimiento acerca de las causas que conducen a la resistencia, entre las que podemos enumerar a la reducción en la acumulación intracelular de la droga, el incremento en los mecanismos de reparación del ADN y la alteración en la expresión de proteínas regulatorias involucradas en vías de apoptosis¹²⁰. Adicionalmente, NF-κB ha sido

identificado como uno de los factores clave entre los mecanismos involucrados. Se ha descrito que distintos inhibidores de NF- κ B conducen a una mejora en la eficacia terapéutica a cisplatino¹²¹.

El tratamiento con cisplatino en la línea H125 activó la vía de NF- κ B (Cap. III, Figura 17). Esto es consecuente con otros reportes donde la translocación nuclear de NF- κ B y su unión al ADN se indujo como consecuencia al tratamiento con diversos agentes quimioterapéuticos en líneas celulares de NSCLC⁵⁵. Verificamos además que CIGB-300 fue capaz de prevenir la activación de NF- κ B (Cap. III, Figura 18), lo que nos motivó a generar un modelo de quimiorresistencia. Elegimos hacerlo a partir de la línea A549 por registrarse reportes previos.

Pudimos desarrollar con éxito un modelo *in vitro* de quimiorresistencia, que mimetiza el esquema clínico de pacientes con resistencia inducida a las terapias basadas en cisplatino⁸⁰ (Cap. III, Figura 20). La línea A549-cispR presentó una IC₅₀ para cisplatino significativamente más alta respecto de su contraparte parental, luego de haber sido tratada a lo largo de seis meses con el quimioterápico. Por el contrario y como era esperado, la línea A549 parental no mostró cambios significativos de la IC₅₀ a cisplatino como consecuencia de haber sido mantenida en cultivo el mismo período de tiempo (Cap III, Figura 19).

La línea celular A549-cispR resultante no presentó cambios en los niveles proteicos de β -catenina respecto de su contraparte parental. En cambio, se observaron menores niveles totales de p65. Más aún, la vía de NF- κ B fue altamente inducida luego de la exposición a cisplatino, en contraste con la línea A549 parental que exhibió el patrón opuesto (Cap. III, Figura 21). El hecho que el tratamiento con cisplatino induzca la vía de NF- κ B en la línea H125 y que lo mismo suceda en la línea A549 pero sólo tras la exposición crónica a este quimioterápico, pone de manifiesto la heterogeneidad entre las líneas en el mecanismo para responder al insulto inductor de muerte celular, probablemente debido a diferencias en su *background* genético. Se ha reportado que el

incremento de la resistencia a cisplatino está asociado también con la disrupción de la función de p53¹²². En este sentido, p53 se activa en respuesta al daño al ADN pero además regula negativamente a NF-κB¹²³. Mientras que la línea A549 posee p53 *wild-type*, la línea H125 es p53^{-/-}. En consecuencia la capacidad de activación de la vía de NF-κB en respuesta a cisplatino podría ser mayor en la H125 debido a la ausencia de p53.

En nuestro modelo de quimiorresistencia, la activación de NF-κB tras el tratamiento con cisplatino es producto de la exposición crónica durante seis meses a este quimioterápico y podría haber sido necesaria para la adquisición de la resistencia. El descenso en los niveles totales de p65, a pesar de resultar inesperado, podría resultar de una alta tasa de retroalimentación negativa causada por la activación crónica de la vía frente a la constante presencia de cisplatino.

CIGB-300 redujo los niveles nucleares de p65 tanto en la A549-cispR como en la A549 parental, ya sea en presencia o no de cisplatino (Cap. III, Figura 22). Sin embargo la terapia combinada no resultó ser más efectiva que los tratamientos por separado en ninguna de las líneas. Luego de haber estudiado en detalle la interacción entre ambas drogas (Cap. III, Figura 23 y Figura 24), todos los valores de CI obtenidos están por encima de 1, oscilando entre un efecto aditivo leve y un antagonismo leve a moderado, dependiendo de la fracción afectada que estemos analizando (equivalencias basadas en la Tabla 2 de Materiales y Métodos).

Notoriamente, la línea celular cisplatino-resistente resultó más sensible al tratamiento con CIGB-300 que su contraparte parental. Esto se verificó por un marcado efecto antiproliferativo en presencia de una dosis alta de CIGB-300, una reducción significativa de la IC₅₀ y un marcado aumento en la muerte celular (Cap. III, Figura 25 y Figura 26). La sensibilización a una droga que inhibe NF-κB (tal como demostró hacerlo CIGB-300) es probablemente causada por la dependencia adquirida a esta vía de señalización en consecuencia a la previa y constante exposición a cisplatino. En este sentido la

distintiva inhibición en los niveles proteicos del blanco de NF- κ B: c-MYC, en las células A549-cispR luego del tratamiento con CIGB-300, podría ser parte del mecanismo responsable del incremento en la sensibilidad a CIGB-300 (Cap. III, Figura 22). Reportes recientes han asociado a c-MYC con la adquisición de resistencia en la línea A549, mientras que su bloqueo induce un aumento en la apoptosis¹²⁴.

El tratamiento con otro inhibidor de la vía de NF- κ B, la Sulfasalazina (SSZ), no presentó el patrón que observamos con CIGB-300. La línea cisplatino-resistente resultó menos afectada por la SSZ que la parental (Anexo, Figura 3). Es posible que otros mecanismos de resistencia, como la resistencia múltiple a drogas (MDR), hayan sido adquiridos durante la exposición a cisplatino y que se manifiesten con este inhibidor, no así con CIGB-300. La proteómica para CIGB-300 en la línea H125 mostró que proteínas asociadas con la MDR se encontraron preferentemente moduladas, entre ellas la disminución en los niveles de YB-1, encargada de la reparación del ADN y sobreexpresada en células resistentes a cisplatino¹²⁵. Los niveles de captación de CIGB-300 y SSZ deberían ser evaluados y contrarrestados en ambas líneas. Por otra parte también es factible que, como discutimos previamente, la sola inhibición de NF- κ B no sea suficiente para inducir un marcado efecto en la muerte celular y que en el caso de CIGB-300, una combinación de la inhibición de NF- κ B con otros estímulos anti-proliferativos productos del bloqueo de CK2 produciría el efecto observado.

El esquema de la Figura 2 resume la interpretación de los resultados recientemente discutidos.

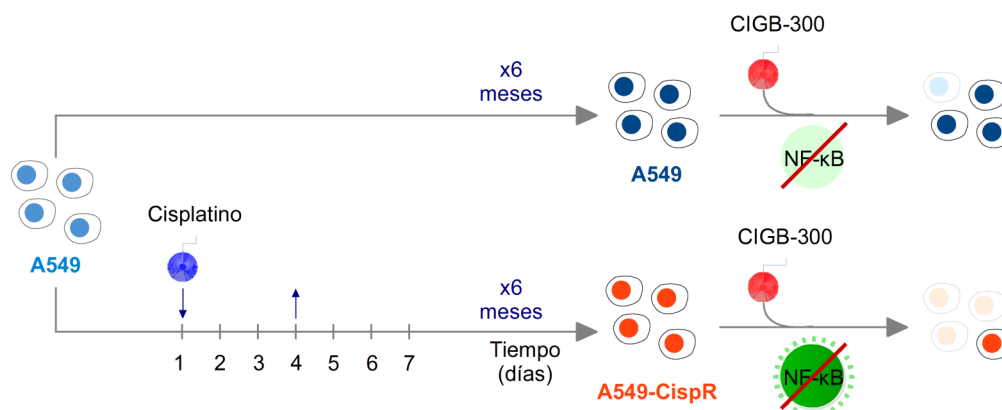


Figura 2: Esquema del efecto de CIGB-300 en un contexto de quimiorresistencia. La exposición prolongada a cisplatino condujo a la inducción de la vía de NF-κB. El bloqueo de la vía por CIGB-300 causa una mayor inducción de muerte celular en la línea cisplatino-resistente.

En función de los resultados presentados, consideramos que el tratamiento con CIGB-300 podría ser de utilidad en pacientes refractarios, luego de la quimioterapia estándar basada en cisplatino. A pesar de ello, son necesarios más ensayos pre-clínicos antes de proponer el enfoque de CIGB-300 como segunda línea terapéutica en ensayos clínicos prospectivos. Como parte de los mismos sugerimos evaluar la efectividad de CIGB-300 en cultivo de tumores *ex vivo*¹²⁶ de pacientes del IOAHR que recibieron o no neoadyuvancia con cisplatino previa a la resección quirúrgica. Esto nos permitiría analizar si los tumores que fueron expuestos a cisplatino responden de manera distintiva a CIGB-300 respecto de aquellos que son vírgenes de tratamiento. Por otra parte, también podría ser relevante estudiar la marcación nuclear de p65 en biopsias de pacientes que recibieron adyuvancia con cisplatino y que resultaron refractarios a la terapia.

Conclusiones

Hemos demostrado que CIGB-300 induce una respuesta anti-proliferativa en distintos modelos de NSCLC. Este efecto fue acompañado por la inhibición de la vía de NF- κ B, evento que se asoció a la aumentada actividad del proteasoma. La dependencia adquirida a la vía de NF- κ B en una línea cisplatino-resistente resultó en una sensibilización al tratamiento con CIGB-300.

En conclusión, comprobamos que CIGB-300 modula vías de señalización dependientes de CK2 y que esto podría tener una potencial utilidad en la terapéutica actual para pacientes con NSCLC.

Anexo

Macros para ImageJ.

```
run("Open...");

do {

run("16-bit");
setAutoThreshold("Default");
setTool("wand");
waitForUser("Haga clic sobre la superficie a medir y luego presione OK.");
run("Measure");
run("Select None");
run("Revert");
run("Open Next");

} while (1>0)
```

Macro 1: Medición de superficies. Usado para calcular el área de las “heridas de migración” y el volumen de los esféricos. Al ejecutarlo aparece el diálogo “Abrir” para seleccionar la primer imagen. Las imágenes subsiguientes se irán abriendo para ser cuantificadas automáticamente, sólo deben estar ordenadas alfabéticamente y en la misma carpeta que la primera.

```
run("Open...");

do {

run("32-bit");
setAutoThreshold("Default dark");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=5-Infinity circularity=0.30-1.00 summarize add");
run("Revert");
waitForUser("Verifique que el ajuste sea correcto y presione OK para continuar.");
roiManager("Delete");
run("Open Next");

} while (1>0)
```

Macro 2: Recuento de núcleos. Usado para cuantificar el número total de células en los ensayos de inmunofluorescencia. Al ejecutarlo aparece el diálogo “Abrir” para seleccionar la primer imagen. Las imágenes subsiguientes se irán abriendo para ser cuantificadas automáticamente, sólo deben estar ordenadas alfabéticamente y en la misma carpeta que la primera.

Ensayo de interacción de drogas, valores.

A549		0,64x IC ₅₀ CIGB-300	0,80x IC ₅₀ CIGB-300	1x IC ₅₀ CIGB-300	1,25x IC ₅₀ CIGB-300	1,56x IC ₅₀ CIGB-300	1,96x IC ₅₀ CIGB-300
	Fa	0,181	0,260	0,587	0,862	0,983	1,070
0,64x IC ₅₀ Cisplatino	0,177	0,425					
0,80x IC ₅₀ Cisplatino	0,211		0,601				
1x IC ₅₀ Cisplatino	0,403			0,829			
1,25x IC ₅₀ Cisplatino	0,544				0,957		
1,56x IC ₅₀ Cisplatino	0,652					0,983	
1,96x IC ₅₀ Cisplatino	0,819						1,069

A549- cispR		0,64x IC ₅₀ CIGB-300	0,80x IC ₅₀ CIGB-300	1x IC ₅₀ CIGB-300	1,25x IC ₅₀ CIGB-300	1,56x IC ₅₀ CIGB-300	1,96x IC ₅₀ CIGB-300
	Fa	0,250	0,373	0,716	0,927	0,968	0,952
0,64x IC ₅₀ Cisplatino	-0,140	0,351					
0,80x IC ₅₀ Cisplatino	0,134		0,756				
1x IC ₅₀ Cisplatino	0,351			0,807			
1,25x IC ₅₀ Cisplatino	0,453				0,944		
1,56x IC ₅₀ Cisplatino	0,551					0,963	
1,96x IC ₅₀ Cisplatino	0,609						0,974

Figura 1: Ensayo de interacción de drogas, valores. Se muestran las Fracciones afectadas (Fa) para cada punto de droga ensayado (cisplatino: columna izquierda, CIGB-300: fila superior) y sus combinaciones (valores escalonados). Los valores corresponden a un experimento representativo.

Curvas de Kaplan Meier

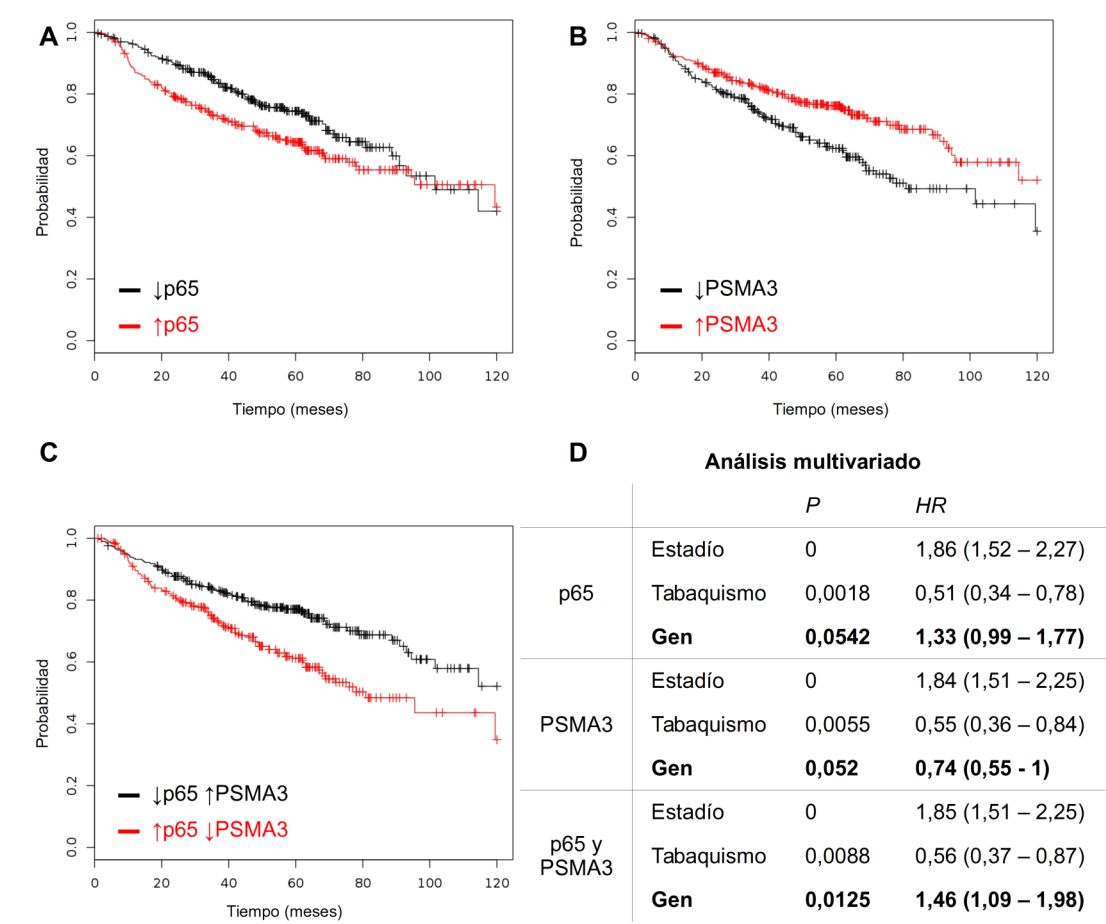
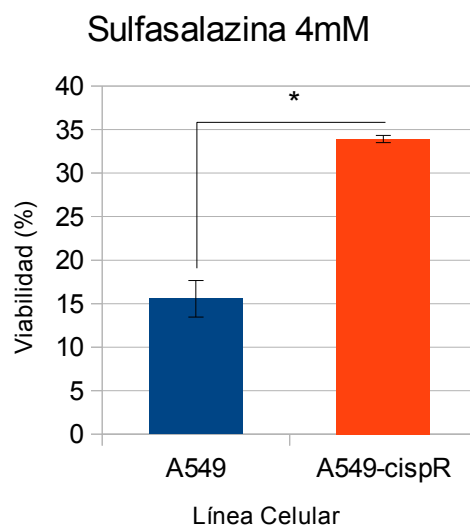


Figura 2: Supervivencia y expresión de p65 y PSMA3 en pacientes. Análisis *in silico* de la supervivencia global (OS) para cáncer de pulmón respecto a la expresión de p65 (Panel A), PSMA3 (Panel B) y su combinación (Panel C). Los gráficos muestran las curvas de Kaplan Meier del análisis univariado (en todos $p < 0,05$, log-rank test). Se detalla en la tabla (Panel D) para cada caso el *P* y el ratio de riesgo de mortalidad (*HR*) del estudio multivariado incluyendo el estadio, el hábito tabáquico y el/los gen/es estudiados/s. Número de pacientes del análisis: 587.

Inhibidor de NF- κ B en línea quimiorresistente



*Figura 3: Sulfasalizina en línea quimiorresistente. El número de células se determinó mediante recuento directo tras el tratamiento con 4mM de SSZ en las líneas A549 y A59-cisplR. La viabilidad se expresa como porcentaje de la condición control (sin tratamiento) para cada línea celular. El gráfico muestra la media $\pm$ E.E. * $p < 0,05$, test-T.*

Referencias

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–74 (2011).
2. Weinberg, R. A. Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Res.* 49, (1989).
3. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27–31 (1995).
4. Mason, S. D. & Joyce, J. A. Proteolytic networks in cancer. *Trends in Cell Biology* 21, 228–237 (2011).
5. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–72 (2002).
6. Torre, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108 (2015).
7. SIVER/INC en base a los datos de Globocan 2012. Incidencia - Instituto Nacional del Cáncer. (2016). Available at: <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/incidencia/>. (Accessed: 6th November 2016)
8. SIVER / INC en base a datos de la DEIS. Mortalidad - Instituto Nacional del Cáncer. (2016). Available at: <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/mortalidad/>. (Accessed: 6th November 2016)
9. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C. & Boffetta, P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur. Respir. J.* 48, 889–902 (2016).
10. Langer, C. J., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E. & Soria, J.-C. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 5311–20 (2010).

Referencias

11. Pisters, K. M. W. et al. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline. *J. Clin. Oncol.* 25, 5506–18 (2007).
12. Spiro, S. G. et al. Chemotherapy versus supportive care in advanced non-small cell lung cancer: improved survival without detriment to quality of life. *Thorax* 59, 828–36 (2004).
13. Tsao, A. S. et al. Scientific advances in lung cancer 2015. *Journal of Thoracic Oncology* 11, 613–638 (2016).
14. Ma, W., Gilligan, B. M., Yuan, J. & Li, T. Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. *J. Hematol. Oncol.* 9, 47 (2016).
15. Herbst, R. S. et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* 387, 1540–1550 (2016).
16. Duncan, J. S. & Litchfield, D. W. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 33–47 (2008).
17. Meggio, F. & Pinna, L. A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17, 349–68 (2003).
18. Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* 369, 1–15 (2003).
19. Faust, M. & Montenarh, M. Subcellular localization of protein kinase CK2. *Cell Tissue Res.* 301, 329–340 (2000).
20. Tawfic, S. et al. Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* 16, 573–82 (2001).

Referencias

21. O-charoenrat, P. et al. Casein kinase II alpha subunit and C1-inhibitor are independent predictors of outcome in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res.* 10, 5792–5803 (2004).
22. Landesman-Bollag, E. et al. Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol. Cell. Biochem.* 227, 153–65 (2001).
23. Piazza, F. et al. Protein kinase CK2 in hematologic malignancies: reliance on a pivotal cell survival regulator by oncogenic signaling pathways. *Leukemia* 26, 1174–9 (2012).
24. Ortega, C. E., Seidner, Y. & Dominguez, I. Mining CK2 in cancer. *PLoS One* 9, e115609 (2014).
25. Wang, G., Ahmad, K. A. & Ahmed, K. Modulation of death receptor-mediated apoptosis by CK2. *Mol. Cell. Biochem.* 274, 201–5 (2005).
26. Ahmad, K. A., Wang, G., Slaton, J., Unger, G. & Ahmed, K. Targeting CK2 for cancer therapy. *Anticancer. Drugs* 16, 1037–43 (2005).
27. Ruzzene, M., Penzo, D. & Pinna, L. A. Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem. J.* 364, 41–7 (2002).
28. Sarno, S., Salvi, M., Battistutta, R., Zanotti, G. & Pinna, L. A. Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 263–70 (2005).
29. Slaton, J. W., Unger, G. M., Sloper, D. T., Davis, A. T. & Ahmed, K. Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol. Cancer Res.* 2, 712–21 (2004).
30. Perea, S. E. et al. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res* 64, 7127–7129 (2004).

Referencias

31. Song, D. H., Sussman, D. J. & Seldin, D. C. Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 23790–7 (2000).
32. Anastas, J. N. & Moon, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 11–26 (2012).
33. Shapiro, M. et al. Wnt pathway activation predicts increased risk of tumor recurrence in patients with stage I nonsmall cell lung cancer. *Ann. Surg.* 257, 548–54 (2013).
34. Homma, M. K., Li, D., Krebs, E. G., Yuasa, Y. & Homma, Y. Association and regulation of casein kinase 2 activity by adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5959–64 (2002).
35. Seldin, D. C. et al. CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumorigenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 274, 63–7 (2005).
36. Wang, S. & Jones, K. A. CK2 Controls the Recruitment of Wnt Regulators to Target Genes In Vivo. *Curr. Biol.* 16, 2239–2244 (2006).
37. Channavajhala, P. & Seldin, D. C. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene* 21, 5280–8 (2002).
38. Landesman-Bollag, E. et al. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 20, 3247–3257 (2001).
39. Tapia, J. C., Torres, V. A., Rodriguez, D. A., Leyton, L. & Quest, A. F. G. Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15079–84 (2006).
40. Sonenshein, G. E. Rel/NF-kappa B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 8, 113–9 (1997).
41. Sun, X.-F. & Zhang, H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol. Histopathol.* 22, 1387–98 (2007).

Referencias

42. Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D. C. & Sonenshein, G. E. Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor-kappaB, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells. *Cancer Res.* 62, 6770–8 (2002).
43. Chantôme, A. et al. Casein kinase II-mediated phosphorylation of NF-kappaB p65 subunit enhances inducible nitric-oxide synthase gene transcription in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 23953–60 (2004).
44. Wang, D., Westerheide, S. D., Hanson, J. L. & Baldwin, A. S. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 275, 32592–7 (2000).
45. McElhinny, J. A., Trushin, S. A., Bren, G. D., Chester, N. & Paya, C. V. Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 899–906 (1996).
46. Eddy, S. F. et al. Inducible IkappaB kinase/IkappaB kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappaB activation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 65, 11375–83 (2005).
47. Krehan, A. Transcription Factors Ets1, NF-kappa B, and Sp1 Are Major Determinants of the Promoter Activity of the Human Protein Kinase CK2alpha Gene. *J. Biol. Chem.* 275, 18327–18336 (2000).
48. Robe, P. A. et al. In vitro and in vivo activity of the nuclear factor-??B inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* 10, 5595–5603 (2004).
49. Awasthi, S. et al. Modulation of cisplatin cytotoxicity by sulphasalazine. *Br. J. Cancer* 70, 190–194 (1994).
50. Lun, M., Zhang, P. L., Siegelmann-Danieli, N., Blasick, T. M. & Brown, R. E. Intracellular inhibitory effects of Velcade correlate with

morphoproteomic expression of phosphorylated-nuclear factor-kappaB and p53 in breast cancer cell lines. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 35, 15–24 (2005).

51. Hideshima, T. et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114, 1046–52 (2009).

52. Oiso, S. et al. Involvement of NF- κ B activation in the cisplatin resistance of human epidermoid carcinoma KCP-4 cells. *Oncol. Rep.* 28, 27–32 (2012).

53. Almeida, L. O. et al. NF κ B mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio* 4, 96–104 (2014).

54. Jin, X. et al. Chemosensitization in non-small cell lung cancer cells by IKK inhibitor occurs via NF- κ B and mitochondrial cytochrome c cascade. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 4596–4607 (2009).

55. Jones, D. R., Broad, R. M., Madrid, L. V, Baldwin, a S. & Mayo, M. W. Inhibition of NF-kappaB sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Ann. Thorac. Surg.* 70, 930–937 (2000).

56. Ludemann, R., Lerea, K. M. & Etlinger, J. D. Copurification of casein kinase II with 20 S proteasomes and phosphorylation of a 30-kDa proteasome subunit. *J. Biol. Chem.* 268, 17413–17417 (1993).

57. Castaño, J. G., Mahillo, E., Arizti, P. & Arribas, J. Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry* 35, 3782–9 (1996).

58. Semplici, F., Meggio, F., Pinna, L. A. & Oliviero, S. CK2-dependent phosphorylation of the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBC3B induces its interaction with β -TrCP and enhances β -catenin degradation. *Oncogene* 21, 3978–3987 (2002).

59. Saccani, S., Marazzi, I., Beg, A. A. & Natoli, G. Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *J. Exp. Med.* 200, 107–13 (2004).
60. Tanaka, T., Grusby, M. J. & Kaisho, T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat. Immunol.* 8, 584–91 (2007).
61. Hochrainer, K. et al. The ubiquitin ligase HERC3 attenuates NF-κB-dependent transcription independently of its enzymatic activity by delivering the RelA subunit for degradation. *Nucleic Acids Res.* 43, 9889–904 (2015).
62. Cozza, G., Pinna, L. A. & Moro, S. Kinase CK2 inhibition: an update. *Curr. Med. Chem.* 20, 671–93 (2013).
63. Perea, S. E. et al. CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biochem.* 316, 163–167 (2008).
64. Perera, Y. et al. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1189–96 (2009).
65. Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. & Pandolfi, P. P. Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 493–505 (2006).
66. Perera, Y. et al. Pharmacologic inhibition of the CK2-mediated phosphorylation of B23/NPM in cancer cells selectively modulates genes related to protein synthesis, energetic metabolism, and ribosomal biogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 404, 103–112 (2015).
67. Lee, G. Y. et al. Comparative Oncogenomics Identifies PSMB4 and SHMT2 as Potential Cancer Driver Genes. *Cancer Res.* 74, 3114–26 (2014).

Referencias

68. Benavent Acero, F. R. et al. Mechanisms of Cellular Uptake, Intracellular Transportation, and Degradation of CIGB-300, a Tat-Conjugated Peptide, in Tumor Cell Lines. *Mol. Pharm.* 11, 1798–807 (2014).
69. Martins, L. R. et al. Targeting chronic lymphocytic leukemia using CIGB-300, a clinical-stage CK2-specific cell-permeable peptide inhibitor. *Oncotarget* 5, 258–63 (2014).
70. Solares, A. M. et al. Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies. *BMC Cancer* 9, 146 (2009).
71. Perea, S. E. et al. CIGB-300, a synthetic peptide-based drug that targets the CK2 phosphoacceptor domain. Translational and clinical research. *Mol. Cell. Biochem.* 356, 45–50 (2011).
72. Sarduy, M. R. et al. Optimizing CIGB-300 intralesional delivery in locally advanced cervical cancer. *Br. J. Cancer* 112, 1636–1643 (2015).
73. Perea, S. E. et al. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res.* 64, 7127–9 (2004).
74. Ziegler, A., Nervi, P., Dürrenberger, M. & Seelig, J. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry* 44, 138–48 (2005).
75. Frommolt, P. & Thomas, R. K. Standardized high-throughput evaluation of cell-based compound screens. *BMC Bioinformatics* 9, 475 (2008).
76. Rodríguez, C. E., Reidel, S. I., Bal de Kier Joffé, E. D., Jasniz, M. A. & Fiszman, G. L. Autophagy Protects from Trastuzumab-Induced Cytotoxicity in HER2 Overexpressing Breast Tumor Spheroids. *PLoS One* 10, e0137920 (2015).

77. Shu, J., Qiu, G. & Mohammad, I. A Semi-automatic Image Analysis Tool for Biomarker Detection in Immunohistochemistry Analysis. in 2013 Seventh International Conference on Image and Graphics 937–942 (IEEE, 2013). doi:10.1109/ICIG.2013.197
78. Zheng, B., Han, M., Bernier, M. & Wen, J. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J.* 276, 2669–85 (2009).
79. Bettinger, B. T., Gilbert, D. M. & Amberg, D. C. Opinion: Actin up in the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 410–415 (2004).
80. Barr, M. P. et al. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One* 8, e54193 (2013).
81. Chou, T.-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 70, 440–6 (2010).
82. BOLTE, S. & CORDELIÈRES, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232 (2006).
83. Dunn, K. W., Kamocka, M. M. & McDonald, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C723–42 (2011).
84. Perera, Y. et al. Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization. *J. Pept. Sci.* 18, 215–23 (2012).
85. Mizumoto, K., Rothman, R. J. & Farber, J. L. Programmed cell death (apoptosis) of mouse fibroblasts is induced by the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Mol. Pharmacol.* 46, (1994).
86. Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D. & Takayama, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release* 164, 192–204 (2012).

87. Desoize, B. & Jardillier, J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36, 193–207
88. Leskow, F. C., Krasnapolski, M. A. & Urtreger, A. J. The pros and cons of targeting protein kinase C (PKC) in the management of cancer patients. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 1961–73 (2011).
89. Tsukioka, Y. et al. Pharmaceutical and biomedical differences between micellar doxorubicin (NK911) and liposomal doxorubicin (Doxil). *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 1145–53 (2002).
90. ElBayoumi, T. A. & Torchilin, V. P. Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.* 15, 1973–80 (2009).
91. Dominguez, I., Sonenshein, G. E. & Seldin, D. C. Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1850–7 (2009).
92. Sarno, S. et al. Development and exploitation of CK2 inhibitors. *Mol. Cell. Biochem.* 274, 69–76 (2005).
93. Chang, M.-S. et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways. *Cell. Signal.* 17, 299–310 (2005).
94. Ampofo, E. et al. Inhibition of protein kinase CK2 suppresses tumor necrosis factor (TNF)- α -induced leukocyte–endothelial cell interaction. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 2123–2136 (2015).
95. Odii, B. O. & Coussons, P. Pharmacological Isolation of Experimental Models of Drug-resistant Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *J. Cancer Ther.* 3, 216–221 (2012).

Referencias

96. Tyagi, A. et al. CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins. *Nucleic Acids Res.* 43, D837–D843 (2015).
97. Perera, Y. et al. Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *Int. J. Cancer* 122, 57–62 (2008).
98. Benavent, F. et al. CIGB-300, an anti-CK2 peptide, inhibits angiogenesis, tumor cell invasion and metastasis in lung cancer models. *Lung Cancer* (2016). doi:10.1016/j.lungcan.2016.05.026
99. Torisawa, Y.-S., Takagi, A., Shiku, H., Yasukawa, T. & Matsue, T. A multicellular spheroid-based drug sensitivity test by scanning electrochemical microscopy. *Oncol. Rep.* 13, 1107–12 (2005).
100. Oloumi, A., MacPhail, S. H., Johnston, P. J., Banáth, J. P. & Olive, P. L. Changes in subcellular distribution of topoisomerase IIalpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors. *Cancer Res.* 60, 5747–53 (2000).
101. Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D. & Takayama, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release* 164, 192–204 (2012).
102. Doublier, S. et al. HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer* 12, 4 (2012).
103. Fayad, W. et al. Restriction of cisplatin induction of acute apoptosis to a subpopulation of cells in a three-dimensional carcinoma culture model. *Int. J. cancer* 125, 2450–5 (2009).
104. Licchesi, J. D. F. et al. Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis* 29, 895–904 (2008).

Referencias

105. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. The I κ B-NF- κ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science* (80-.). 298, (2002).
106. Nelson, D. E. et al. Oscillations in NF- κ B Signaling Control the Dynamics of Gene Expression. *Science* (80-.). 306, (2004).
107. Bian, Y. et al. Abstract 2687: CK2 inhibitor CX-4945 modulates AKT, NF- κ B, TP53 and MEK inhibitor PD-325901 targets AP1 mediated CK2 inhibitor drug resistance in head and neck cancer. *Cancer Res.* 74, 2687–2687 (2014).
108. Manni, S. et al. Protein Kinase CK2 Inhibition Down Modulates the NF- κ B and STAT3 Survival Pathways, Enhances the Cellular Proteotoxic Stress and Synergistically Boosts the Cytotoxic Effect of Bortezomib on Multiple Myeloma and Mantle Cell Lymphoma Cells. *PLoS One* 8, e75280 (2013).
109. Stathopoulos, G. T. et al. Host nuclear factor-kappaB activation potentiates lung cancer metastasis. *Mol. Cancer Res.* 6, 364–71 (2008).
110. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–7
111. Yeh, C.-T., Wu, C.-H. & Yen, G.-C. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1285–95 (2010).
112. Helbig, G. et al. NF- κ B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 278, 21631–21638 (2003).
113. Yang, K. NF- κ B Signaling Pathway Confers Neuroblastoma Cells Migration and Invasion Ability via the Regulation of CXCR4. *Med. Sci. Monit.* 20, 2746–2752 (2014).

Referencias

114. Hoeller, D. & Dikic, I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 458, 438–44 (2009).
115. Zanin, S. et al. Chimeric peptides as modulators of CK2-dependent signaling: Mechanism of action and off-target effects. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1854, 1694–1707 (2015).
116. Bose, S., Stratford, F. L. L., Broadfoot, K. I., Mason, G. G. F. & Rivett, A. J. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem. J.* 378, 177–84 (2004).
117. Vilchez, D. et al. Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature* 489, 304–8 (2012).
118. Györfy, B., Surowiak, P., Budczies, J. & Lánczky, A. Online Survival Analysis Software to Assess the Prognostic Value of Biomarkers Using Transcriptomic Data in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS One* 8, e82241 (2013).
119. Qaiser, F. et al. Examination of CK2 α and NF- κ B p65 expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer tissues. *Mol. Cell. Biochem.* 420, 43–51 (2016).
120. Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* 478, 23–43 (2001).
121. Mabuchi, S. et al. Inhibition of NF κ B increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *J. Biol. Chem.* 279, 23477–85 (2004).
122. Vasey, P. A., Jones, N. A., Jenkins, S., Dive, C. & Brown, R. Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.* 50, 1536–40 (1996).
123. Meylan, E. et al. Requirement for NF- κ B signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 462, 104–7 (2009).

Referencias

124. Xie, C. et al. C-Myc participates in β -catenin-mediated drug resistance in A549/DDP lung adenocarcinoma cells. *APMIS* 122, 1251–8 (2014).
125. Yahata, H. et al. Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 128, 621–626 (2002).
126. Joshi, K. et al. Method for novel anti-cancer drug development using tumor explants of surgical specimens. *J. Vis. Exp.* (2011). doi:10.3791/2846
127. Hirsch, F. R. et al. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *Lancet* 388, 1012–1024 (2016).

Índice de figuras

Introducción

Figura 1: Incidencia y mortalidad de distintos tipos de tumores en Argentina..	15
Figura 2: Esquema del pulmón y origen de los principales subtipos de NSCLC..	17
Figura 3: Mutaciones conductoras para adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas.....	19
Figura 4: Estructura cristalográfica de la enzima CK2.....	21
Figura 5: Mecanismos de regulación de la holoenzima CK2.....	24
Figura 6: Regulación de CK2 sobre vías de señalización implicadas en la supervivencia celular.....	26
Figura 7: Esquema de la vía Wnt/ β -catenina.....	29
Figura 8: Activación de la vía canónica de NF- κ B.....	32
Figura 9: ensayo de inhibición de la actividad quinasa de CK2 por adhesión de un ligando capaz de bloquear la unión a su sustrato.....	36
Figura 10: Esquema del péptido CIGB-300.....	38

Materiales y métodos

Figura 1: Tinción por Naranja de Acridina / Bromuro de Etidio. Ejemplos.....	45
Figura 2: Controles de pureza y de carga nuclear.....	49
Figura 3: Control de especificidad de anticuerpo primario.....	55

Resultados

Capítulo I

Figura 1: Curvas de inhibición de la proliferación mediada por CIGB-300 sobre líneas de NSCLC.....	59
Figura 2: Ensayo de apoptosis por inmunofluorescencia con AnexinaV-FITC/IP.....	60
Figura 3: Cinética de crecimiento de esferoides formados a partir de distintos números iniciales de células.....	62
Figura 4: Curva de crecimiento de esferoides de la línea H125 tratados o no con CIGB-300.....	63
Figura 5: Estudio de internalización en esferoides.....	64
Figura 6: Capacidad migratoria y secreción de enzimas proteolíticas.....	65

Capítulo II

Figura 7: Vía de señalización Wnt/ β -catenina.....	68
Figura 8: Estudio del eje NF- κ B a tiempos largos de tratamiento.....	70
Figura 9: Estudio del eje NF- κ B a tiempos de tratamiento cortos.....	71
Figura 10: Distribución subcelular de p65.....	72
Figura 11: Distribución subcelular de p65 por inmunofluorescencia.....	73
Figura 12: Efectos genómicos sobre la vía de NF- κ B.....	75
Figura 13: Intermediarios de señalización de NF- κ B.....	76
Figura 14: Distribución subcelular de CIGB-300 y de la proteína α 7/C8 del proteasoma.....	78

Índice de figuras

Figura 15: Actividad del proteasoma.....	79
Figura 16: Niveles de p65 nuclear y degradación proteasomal.....	80
<i>Capítulo III</i>	
Figura 17: Efecto del cisplatino en la línea H125.....	82
Figura 18: Efecto del cisplatino y CIGB-300 en la vía de NF- κ B.....	83
Figura 19: Protocolo para la obtención de la línea A549 resistente a cisplatino..	
.....	84
Figura 20: Línea A549 cisplatino resistente.....	85
Figura 21: Vía de NF- κ B en la línea quimiorresistente.....	87
Figura 22: CIGB-300 en línea quimiorresistente, vía NF- κ B.....	88
Figura 23: Combinación de cisplatino y CIGB-300, capacidad proliferativa.....	90
Figura 24: Ensayo de interacción de Cisplatino y CIGB-300.....	92
Figura 25: CIGB-300 en línea quimiorresistente.....	93
Figura 26: Inducción de muerte celular por CIGB-300 en línea quimiorresistente.....	94
 Discusión	
Figura 1: Modelo propuesto para el mecanismo de inhibición de NF- κ B.....	107
Figura 2: Esquema del efecto de CIGB-300 en un contexto de quimiorresistencia.....	111
 Anexo	
Figura 1: Ensayo de interacción de drogas, valores.....	114
Figura 2: Supervivencia y expresión de p65 y PSMA3 en pacientes.....	115
Figura 3: Sulfasalizina en línea quimiorresistente.....	116