

Tesis de Licenciatura

Búsqueda de inhibidores de Topoisomerasa II con potencial aplicación para el tratamiento de tumores de cerebro humanos utilizando un sistema de mini-unidades de tejido

Vita, Marina Fernanda

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vita, Marina Fernanda. (). Búsqueda de inhibidores de Topoisomerasa II con potencial aplicación para el tratamiento de tumores de cerebro humanos utilizando un sistema de mini-unidades de tejido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000706_Vita

Cita tipo Chicago:

Vita, Marina Fernanda. "Búsqueda de inhibidores de Topoisomerasa II con potencial aplicación para el tratamiento de tumores de cerebro humanos utilizando un sistema de mini-unidades de tejido". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000706_Vita

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis de Licenciatura

**Búsqueda de inhibidores de Topoisomerasa II
con potencial aplicación para el tratamiento de
tumores de cerebro humanos utilizando un
sistema de mini-unidades de tejido**

Marina Fernanda Vita

Director: Dr. Héctor Carminatti
Co-director: Dr. Victor Idoyaga Vargas
Instituto de Investigaciones Bioquímicas
Fundación Campomar

Diciembre de 1999

*A mis padres,
a mis hermanas y
a Nico, Leo y Vicky.*

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUCCION.....	4
1.1. Las topoisomerasas: generalidades.....	4
1.1.2. Estructura	6
1.2. Los inhibidores de topoisomerasa en el tratamiento de tumores...	7
1.3. Gliomas.....	10
1.4. Objetivos del presente trabajo.....	11
2. MATERIALES Y METODOS.....	13
3. RESULTADOS.....	19
3.1. Efecto de inhibidores de Topoisomerasa II sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes.....	19
3.2. Efecto temporal de la <i>menadiona</i> sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes.....	21
3.3. Efecto de la <i>menadiona</i> sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas adultas.....	22
3.4. Efecto de la <i>menadiona</i> sobre la captación de [³ H-metil]-timidina en corteza cerebral de ratas jóvenes.....	23
3.5. Efecto de la <i>N-etil-maleimida</i> (NEM) sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes.....	25

	Página
3.6. Efecto de <i>N-etil-maleimida</i> (NEM) sobre el efecto inhibitorio de la <i>menadiona</i>	26
3.7.Efecto irreversible de la <i>menadiona</i> sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes.....	27
3.8. Efecto de la <i>menadiona</i> sobre la síntesis de proteínas en corteza cerebral de ratas jóvenes.....	29
3.9.Efecto de la <i>menadiona</i> sobre la síntesis de ADN asociada a procesos reparativos en corteza cerebral de ratas adultas.....	30
3.10. Efectos del <i>m-AMSA</i> , <i>ellipticina</i> y <i>menadiona</i> sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas adultas.....	31
4. DISCUSION	33
4.1. Proliferación celular en la corteza cerebral de rata.....	33
4.2. La barrera hematoencefálica y su importancia en el tratamiento de enfermedades del SNC.....	35
4.3. Efectos de la <i>menadiona</i> sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata en desarrollo.....	36
4.4. Efecto de la <i>menadiona</i> sobre la síntesis de ADN asociada a procesos reparativos (UDS).....	39
4.5. Potencial uso clínico de la <i>menadiona</i>	39
Agradecimientos	41
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42

RESUMEN

En la corteza cerebral de rata la síntesis de ADN asociada a procesos replicativos y reparativos varía durante el desarrollo (en las ratas jóvenes el 90% de la síntesis de ADN se asocia a replicación, mientras que en las adultas no alcanza más del 40 %; en ambos casos, el porcentaje restante se asocia a reparación). Por otra parte, la actividad proliferativa de los tumores de cerebro es marcadamente mayor que la del tejido normal circundante. Por lo tanto, la comparación del efecto de drogas sobre la síntesis de ADN total en corteza cerebral de rata durante el desarrollo permite identificar inhibidores específicos de la replicación con potencial aplicación para el tratamiento de tumores.

Mediante el uso de un método basado en la generación de mini-unidades de tejido e incubaciones cortas con [³H-metil]-timidina, se estudió el efecto de varios inhibidores de topoisomerasas (*ellipticina*, *m-AMSA*, *menadiona*) sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata de distintas edades. En tejido proveniente de ratas de 5 días postnatales la *menadiona*, a diferencia de los otros agentes testeados, inhibió significativamente la síntesis de ADN y proteínas de manera concentración-dependiente ($IC_{50} \cong 20$ y $25 \mu M$ respectivamente) dentro de los 60 minutos de incubación. Este efecto inhibitorio fue irreversible y potenciado por el co-tratamiento con *n-etil-maleimida* ($50 \mu M$). En cambio, en corteza cerebral adulta, la *menadiona* no tuvo ningún efecto significativo sobre la síntesis de ADN, y el tratamiento con *hidroxiurea* (10mM) no modificó el efecto de la menadiona.

Estos resultados indican que: 1) la *menadiona* inhibe selectivamente la síntesis de ADN conectada con procesos replicativos, 2) el efecto inhibitorio es

independiente de la producción de especies reactivas de oxígeno y probablemente debido a la inhibición de topoisomerasa II, 3) en corteza cerebral de rata adulta, la *menadiona* induce síntesis de ADN asociada a procesos reparativos y 4) se requieren experimentos adicionales para determinar el potencial uso clínico y la toxicidad de la *menadiona* en combinación con NEM u otros agentes deplecionantes de grupos tioles.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

m-AMSA: 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

BSA: albúmina de suero bovino

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

E: ellipticina, 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole

EDTA: Etilendiamina-ácido tetraacético

IC₅₀: concentración inhibitoria 50

NEM: n-etil-maleimida

M: menadiona, 2-methyl-1,4 naphthoquinona, vitamina K₃

MEM: Eagle's minimun esencial media

MUT: mini-unidades de tejido

SNC: sistema nervioso central

MDR: proteína de multiresistencia a drogas

MPR: proteína asociada a multiresistencia a drogas

PBS: buffer bi fosfato

PgP: transportador asociado con la proteína de multiresistencia a drogas

P5: cinco días postnatales

TCA: ácido tricloroacético

SNC: Sistema Nervioso Central

1. INTRODUCCION

1.1. Las topoisomerasas: generalidades

Las topoisomerasas son enzimas que participan virtualmente en todos los aspectos del metabolismo del ácido desoxiribonucleico (ADN), incluyendo replicación, transcripción, estabilidad genómica y reparación, produciendo cambios en el estado topológico de este ácido nucleico a través de la escisión y posterior unión de sus cadenas. Estas enzimas juegan un papel importante en la replicación del ADN, organización y segregación de los cromosomas y son esenciales para la supervivencia de todos los organismos eucariotas y procariotas (Wang 1996).

Las topoisomerasas se dividen en dos clases según el mecanismo de acción que emplean: las de tipo I actúan mediante el clivaje transitorio de una cadena simple de ADN, las de tipo II, en cambio clivan temporalmente la doble cadena de ADN (Wang 1996).

La topoisomerasa II cliva ambas cadenas del ácido nucleico, pasa una doble hélice intacta a través del corte y religa la cadena clivada (Fig. 1.1); sólo la orientación espacial del material genético se altera durante la reacción. Para preservar la integridad química del ADN, la enzima genera puentes proteicos que se extienden sobre el corte transitorio del ácido nucleico requerido para el pasaje de la otra hebra. Estos puentes se forman por uniones fosfotirosina covalentes establecidas entre el sitio activo de la enzima y el fosfato terminal de ADN nuevamente generado. Debido a que el complejo enzima-ADN clivado conserva la energía química de la unión fosfodiéster, no se requiere fuente de energía externa para el clivaje y posterior "religación" del ADN (por la enzima).

Sin embargo se presume que debido a la reorientación estructural masiva de la enzima que acompaña al pasaje de la doble cadena de ADN, la reacción catalítica completa ocurre a expensas de la hidrólisis de ATP (Burden y Osheroff 1998).

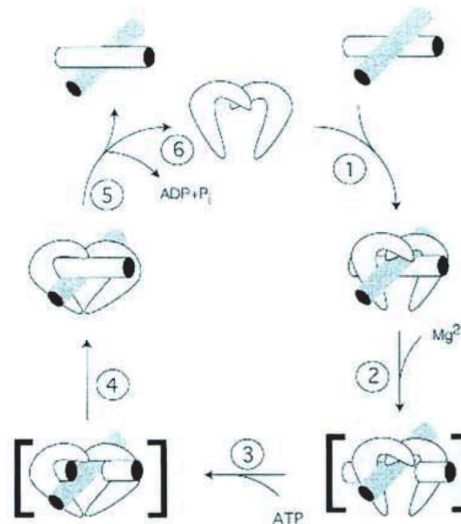


Fig.1.1. *Ciclo catalítico de la Topoisomerasa II.* (1) Unión al ADN, (2) Paso previo al pasaje de ADN, (3) Pasaje de la cadena de ADN, (4) Paso posterior al pasaje de ADN, (5) Hidrólisis del ATP, (6) Recuperación de la enzima.

La topoisomerasa II puede clivar y unir la doble hélice de ADN en ausencia de ATP formando una mezcla en equilibrio de al menos dos tipos de complejos: clivable y no clivable (Chen y Liu 1994).

Considerando la importancia que la topoisomerasa II pueda tener para las células eucariotas en el tratamiento quimioterapéutico de cánceres humanos, es esencial entender las funciones y propiedades farmacológicas de esta enzima.

1.1.2. Estructura

La topoisomerasa II funciona como una enzima homodimérica con una masa promotora molecular de 160 a 180 kDa aproximadamente. Cada monómero se divide en tres dominios distintos (fig. 1.2). El dominio N-terminal (que comprende los primeros 660 aminoácidos) contiene secuencias consenso para unión de ATP. El dominio central de la enzima (que se extiende aproximadamente hasta los 1200 aminoácidos) contiene el sitio activo con el residuo de tirosina que forma la unión covalente con el ADN durante la escisión. El dominio C-terminal varía entre especies, está altamente cargado y contiene secuencias de localización nuclear así como sitios que son fosforilados in vivo, aunque el rol de esta subunidad no es claro aún (Burden y Osheroff 1998).

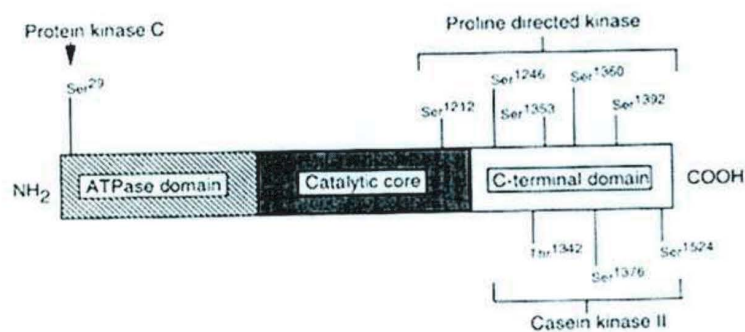


Fig. 1.2. *Dominios de la Topoisomerasa II*. Se ilustran los tres dominios de la topoisomerasa II de eucariotas. El dominio N-terminal se extiende desde el aminoácido 1 al 660 aproximadamente, el dominio central se extiende desde el aminoácido 660 al 1200 aproximadamente y el dominio C-terminal se extiende aproximadamente desde el aminoácido 1200 hasta el C-terminal de la enzima.

Existen, en vertebrados, dos isoformas de esta enzima altamente relacionadas, llamadas α y β . Ambas comparten una extensa homología de secuencia (aproximadamente 70%), pero están codificadas por genes diferentes y pueden distinguirse por sus masas moleculares (~ 170kDa y ~180kDa respectivamente). No están bien establecidas las diferencias funcionales de ambas isoformas, sin embargo, mientras que las concentraciones de topoisomerasa II β se mantienen constantes en la célula y en las distintas fases del ciclo celular, los niveles de topoisomerasa II α varían según el estado proliferativo de la célula. Las concentraciones de la isoforma α aumentan 2-3 veces durante G2/M y es algunos órdenes de magnitud más alto en células en estado proliferativo comparado con poblaciones quiescentes (Burden y Osheroff 1998).

1.2. Rol de los inhibidores de topoisomerasas en el tratamiento de tumores

Las células tumorales tienen una alta tasa de replicación, por este motivo las topoisomerasas son el blanco de muchos agentes anticancerígenos usados corrientemente: varias drogas (*doxorubicina*, *daunorubicina*, *idarubicina*, *mitoxantrone*, *etopósido*, *tenipósido*), actualmente aprobadas para el tratamiento del cáncer por la FDA (the United States Food and Drug Administration), tienen como blanco principal a la topoisomerasa II. Estos agentes son un componente de la terapia curativa para leucemias de adultos y niños, linfomas de adultos y niños (Hodgking's y no-Hodgkin's), cáncer testicular, cáncer de pulmón (small cell lung cancer) y, como adyuvante, en cáncer de mama. Otras drogas que inhiben o interfieren en la actividad

catalítica de la topoisomerasa II han demostrado tener actividad antitumoral en estudios con humanos y con animales, pero todavía no fueron aprobados para uso clínico.

Desafortunadamente, estos agentes tienen toxicidades significativas, que incluyen mielosupresión, infecciones graves, alopecia (pérdida de pelo), náuseas, un riesgo incrementado de crecimiento tardío de leucemias agudas no linfocíticas y en el caso de las antraciclinas, fallas de corazón congestivas. Por lo tanto, se está promoviendo el estudio de nuevos agentes que inhiban a esta enzima y que sean menos tóxicos. Se están probando varios compuestos, en modelos animales y humanos, que inhiben a la topoisomerasa II y que han demostrado tener actividad antitumoral. Estos agentes aún no han sido aprobados para uso clínico todavía (Hande 1998).

En el caso de los tumores de cerebro, el uso de inhibidores de topoisomerasas es limitado y en la actualidad no se usan corrientemente para el tratamiento de estos tumores. Parte de esta limitación esta dada por la presencia de la barrera hematoencefálica que limita el pasaje de drogas al SNC. Esto impide que se logren concentraciones adecuadas de la drogas en el SNC y con el riesgo de que, en cambio, se produzcan efectos tóxicos en el resto de los tejidos. Recientemente, en un modelo animal de tumores de cerebro se ha reportado que utilizando *etopósido* (un inhibidor de la topoisomerasa II) combinado con terapia de rescate con *ICRF-187* es posible incrementar la concentración de drogas en el SNC y esto resultó en una mayor sobrevida de los animales (Jensen y Schested 1997).

Los datos anteriormente mencionados sugieren que los inhibidores de topoisomerasa II pueden ser útiles para el tratamiento de tumores de cerebro si se logran concentraciones adecuadas de la droga en el SNC.

Otros factores son importantes: 1) Los tumores de crecimiento lento con concentraciones bajas de topoisomerasa II son más resistentes a los inhibidores de topoisomerasa II. Segundo, la mayoría de los agentes inhibidores de topoisomerasa II son sustratos para PgP (el transportador asociado con la proteína de multiresistencia a drogas (MDR)) o son sustratos para MPR (la proteína asociada a la multiresistencia a drogas). Por lo tanto los tumores MDR o MPR positivos son menos efectivamente tratados con inhibidores de topoisomerasa II. Por último, mutaciones o alteraciones en los sitios de unión en la enzima están asociados con el desarrollo de células tumorales resistentes (Hande 1998).

La resistencia a drogas, tanto intrínseca como adquirida, es uno de los mayores problemas en la quimioterapia contra el cáncer. En teoría, la resistencia a drogas por parte de las células tumorales puede ocurrir por alteraciones en cualquier paso del camino de la muerte celular que produce la droga anticancerígena particular. Otros factores que han sido implicados en el desarrollo de células resistentes a drogas son : alteraciones en la progresión del ciclo celular, transporte, metabolismo y blanco de la droga así como la progresión del daño celular. Particularmente, se documentó resistencia a varios inhibidores de topoisomerasas I y II en cultivos de células de tejidos relacionado con la sobreexpresión de MDR1, reducción en los niveles de topoisomerasa, mutantes de topoisomerasa resistentes a droga, alargamiento en el tiempo del ciclo celular y alteraciones en las funciones de reparación del ADN. La menadiona (vitamina K₃) y derivados de batracylina son eficaces en el tratamiento de células cancerígenas que expresan el MDR1 tanto en cultivos de células como en modelos animales (Chen y Liu 1994).

1.3. Gliomas

Los gliomas constituyen los tumores primarios más frecuentes en los adultos (Kleihues et al. 1993). La forma más maligna de estos tumores, el glioblastoma multiforme, tiene una sobrevida de entre 9 -12 meses (Burger y Green 1987). Aunque los tratamientos basados en cirugía y radiación han aumentado la sobrevida, los pacientes no sobreviven por períodos largos (Davis y col. 1998). Además, estos tumores son altamente proliferativos e infiltran regiones de tejido normal haciendo que la completa cirugía del tumor y el tratamiento local sean prácticamente imposibles (Jung y col. 1998). Todas estas características hacen que este tumor sea la tercera causa de muerte por cáncer en adultos jóvenes (Deen y col. 1993).

El conocimiento de los mecanismos regulatorios que controlan la proliferación en el tejido normal junto con el conocimiento actual de la bioquímica, regulación y función de la topoisomerasa II, son importantes para el desarrollo de nuevos inhibidores o mecanismos de prevención de resistencia a drogas.

En la corteza cerebral de rata existe una regulación diferencial edad-dependiente de la síntesis de ADN conectada con la replicación o con la reparación. Mediante estudios utilizando *hidroxiurea*, una droga que inhibe selectivamente la síntesis de ADN conectada con replicación pero que no afecta la síntesis de ADN conectada con procesos reparativos, se determinó que en ratas jóvenes (1-2 semanas postnatales) hasta el 90 % de la incorporación de [³H-metil]-timidina a ADN es para replicación. En cambio, en corteza cerebral de ratas adultas hasta el 60 % de la síntesis de ADN es para procesos reparativos (Vilenchik y Tretjak 1977). Además, como se mencionó, la topoisomerasa II está involucrada en los procesos de replicación y

reparación, entre otros. Por ello, debido a la diferente actividad proliferativa del tejido cerebral de la corteza de rata durante el desarrollo, es posible identificar inhibidores de la síntesis de ADN que tengan que las siguientes características:

- 1) Inhiban la síntesis del ácido nucleico en tejido altamente proliferativo (corteza de cerebro de ratas jóvenes o tejido tumoral).
- 2) Posean bajo efecto inhibitorio sobre el tejido cerebral normal adulto.

1.4. Objetivos del presente trabajo

El objetivo de este trabajo fue hacer una búsqueda de inhibidores de topoisomerasa II con posibles aplicaciones para el tratamiento de tumores del SNC que a la vez posean potente actividad antiproliferativa en tejido tumoral y baja o nula toxicidad para el tejido cerebral normal.

Como estrategia experimental se utilizó un método recientemente desarrollado en nuestro laboratorio que mide simultáneamente la actividad proliferativa y la quimiosensibilidad del tejido (Yakisich et al. 1998). Mini-unidades de tejido, proveniente de corteza cerebral de rata de dos edades diferentes : 1) cinco días postnatales (P5), donde la actividad proliferativa del tejido es alta, y 2) adultas mayores a 30 días postnatales ($P > 30$), donde la proliferación es aproximadamente 80-100 veces menor (Altman y Das 1966, Sung 1969, Yakisich y col. 1998). Las mini-unidades se incubaron con inhibidores de la topoisomerasa II (*ellipticina*, *m-AMSA*, *menadiona*) aún no usados en la clínica de bajo peso molecular y liposolubles, ya que estas características son esenciales para que las drogas atraviesen la barrera hematoencefálica (Pardridge 1998).

Esta estrategia ha permitido identificar previamente una droga con esas características: la *roscovitina*. Esta droga ya ha sido probada in vitro en muestras de tumores de cerebro humano (Yakisich y col. 1999).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Animales

Ratas Wistar se adquirieron en el IBYME (Instituto de Biología y Medicina Experimental), Buenos Aires, Argentina.

2.2. Reactivos

Dimetilsulfóxido (DMSO), se compró a MERCK KGaA, Alemania. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y Eagle's minimun esencial media (MEM) sin leucina se compraron a Gibco/Life Technologies. La [³H-metil]-timidina y la L-[4,5-³H]leucina se compraron a NEN products (Boston MA) y a Amersahm (Sweden) respectivamente. La *menadiona* (vitamina K₃), la *ellipticina*, la *amsacrina* (m-AMSA) y la *hidroxiurea* se compraron a Sigma (St. Louis, USA). Todos los otros reactivos que se emplearon fueron de grado analítico o del más alto grado disponible.

2.3. Preparación de las drogas

La *menadiona*, la *ellipticina*, la *m-AMSA* y la *N-etil-maleimida* (NEM) se prepararon como solución stock en DMSO (100mM, 25 mM, 50 mM y 250 mM respectivamente) y se guardaron a -20 °C. En todos los casos las diluciones finales se hicieron en DMEM, manteniendo la concentración de DMSO menor del 1 % (v/v). DMSO solo, a las mismas concentraciones, se utilizó como control. Esta concentración de DMSO ($\leq 1\%$ v/v) hasta 3 horas de incubación

no tiene ningún efecto sobre la síntesis de ADN en cultivos de mini-unidades provenientes de corteza cerebral de rata (Yakisich y col. 1999).

2.4. Generación de las mini-unidades de tejido, preparación de las muestras

Las mini-unidades se prepararon utilizando como base el método desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Alperin y col. 1986) con algunas modificaciones (Yakisich y col. 1998, Yakisich y col. 1999). Brevemente, ratas Wistar de distintas edades, fueron decapitadas y la corteza cerebral fue rápidamente disecada y transferida a un tubo cónico de 15 ml con DMEM a +37 °C. El tejido se fragmentó inmediatamente mediante aspirado y expelido varias veces con pipeta Pasteur, y una vez con la micropipeta P1000 para homogeneizar bien el tejido. Las mini-unidades obtenidas de esta manera se sedimentaron a 1 x g, se lavaron dos veces con DMEM a +37 °C, se transfirieron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 segundos. El sobrenadante se descartó y el tejido se sembró en placas de 24 cavidades (COSTAR, CORNING, NY cat # 14831). A cada cavidad se le agregó previamente 300 µl de DMEM a 37 °C conteniendo 4 µCi/ml [³H-metil]-timidina y concentraciones apropiadas de la droga en estudio o el vehículo apropiado (control). Para estandarizar en la medida de lo posible la cantidad de tejido depositado en cada cavidad, se cortó 0,5 cm la punta de un tip amarillo y se sembró 6 µl de mini-unidades en cada cavidad. Luego las placas se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, durante 30 - 90 minutos. Luego de la incubación el contenido de cada cavidad se transfirió a un tubo Eppendorf. A partir de este momento todos los pasos se realizaron en hielo. Cada punto experimental se determinó por cuadruplicado. Las muestras

se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 segundos , se descartó el sobrenadante, los pellets se lavaron con PBS (Na_2HPO_4 8.1 mM, NaH_2PO_4 1.9 mM, NaCl 154mM, pH 7.4) frío, y se procedió a homogeneizar por sonicación en 0,5 ml de EDTA-PBS (Na_2HPO_4 0.05M, NaCl 2M, EDTA 0.02M, pH 7.4). Luego de este paso las muestras pueden ser guardadas a -80°C ya que el EDTA previene la actividad DNAsa (Labarca y Paigen 1980).

2.5. Determinación de la incorporación de [^3H -metil]-timidina al ADN

De cada muestra homogeneizada , se separaron 12 μl que se usaron para determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Lowry (Lowry y col. 1951). Una alícuota de 400 μl se mezcló con 1 ml de EDTA-PBS conteniendo 14 % p/v de TCA (concentración final 10 %) y se incubó durante 10 minutos en hielo. El ADN se precipitó por centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C en centrífuga de Eppendorf. Los sobrenadantes se descartaron y se agregó 1,5 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold X R, Packard Instrument Company). Los tubos Eppendorf se colocaron en viales de vidrio y la radioactividad se contó en un contador de centelleo líquido (Contador de Centelleo Líquido Wallac). La incorporación de [^3H -metil]-timidina al ADN se expresó como cpm/mg de proteína.

2.6. Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col. 1951), usando albúmina de suero bovino (BSA) disuelto en EDTA-PBS como estándar. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.7. Determinación de la velocidad de proliferación celular (síntesis de ADN) y la sensibilidad a drogas

La velocidad de proliferación celular o índice de proliferación se calculó como cpm/mg de proteína/min. La sensibilidad a las drogas o al vehículo se determinó como el porcentaje de inhibición de la velocidad de proliferación celular o como el porcentaje de control de la tasa de proliferación.

Utilizando la misma metodología con algunas modificaciones se estudiaron otros aspectos del efecto de las drogas.

2.8. Determinación de la captación de [³H-metil]-timidina

La captación de [³H-metil]-timidina a las células se determinó de la siguiente manera: las mini-unidades de tejido se incubaron en DMEM conteniendo la droga apropiada o el vehículo solo como control. Luego de 60 minutos de incubación, se agregó 4 µCi/ml [³H-metil]-timidina a cada cavidad y se incubó durante 15 minutos. Luego de la incubación el contenido de cada cavidad – que representa un punto experimental – se transfirió a un tubo Eppendorf y se colocó en hielo. Luego de centrifugar los tubos a 1.000 rpm durante 5 segundos, se descartaron los sobrenadantes y los pellets se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío y luego fueron homogeneizados por sonicación en 0,5 ml de EDTA-PBS frío. De cada muestra homogeneizada se utilizaron 5 µl para determinación de proteínas mediante el método de Lowry. A una alícuota de 100 µl se le agregó 3,5 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold X R, Packard Instrument Company) y se determinó la cantidad de radioactividad en un contador de centelleo líquido (Contador de Centelleo Líquido Wallac). La

captación del precursor radioactivo se calculó como la cantidad de [^3H -metil]-timidina incorporada en las mini-unidades de tejido por mg de proteína (cpm/mg de proteína). Los resultados se expresaron como porcentaje de captación de [^3H -metil]-timidina. Es importante destacar que este procedimiento permite determinar la cantidad de [^3H -metil]-timidina total ([^3H -metil]-timidina incorporada a ADN + [^3H -metil]-timidina libre) que fue captada por las mini-unidades en el período de tiempo estudiado (15 minutos).

2.9. Determinación de la síntesis de proteínas

La velocidad de síntesis de proteínas se determinó exactamente como se midió la velocidad de síntesis de ADN excepto que se utilizó medio esencial mínimo de Eagle (MEM) sin leucina en vez de DMEM y se empleó L-[4,5- ^3H]-leucina como precursor radioactivo.

2.10. Reversibilidad de la inhibición de la síntesis de ADN mediada por inhibidores de topoisomerasa II

Se hicieron dos experimentos en paralelo. Por un lado, mini-unidades de corteza cerebral de rata de 5 días postnatales se incubaron con DMEM conteniendo 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina más DMSO solo (control), o *menadiona* (50 μM) durante 60 minutos y luego se procesaron para determinación de incorporación de [^3H -metil]-timidina al ADN.

Por otra parte, mini-unidades provenientes del mismo animal se incubaron con DMEM conteniendo DMSO solo (control) o *menadiona* (50 μM) durante 60 minutos. Este tiempo de incubación con el inhibidor de

topoisomerasa II da una fuerte inhibición de la síntesis de ADN. Luego de la incubación las mini-unidades se recogieron en tubos Eppendorfs , se lavaron una vez con 1ml de DMEM a 37 °C y se incubaron con DMEM solo durante 30 minutos para dejar que las células se recuperen. Luego, 10 µl de DMEM conteniendo [³H-metil]-timidina (concentración final 4µCi/ml) se agregó a cada cavidad, se incubó durante 60 minutos y se procesó para determinación de incorporación de [³H-metil]-timidina al ADN.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de inhibidores de Topoisomerasa II sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes

Se estudió el efecto de tres inhibidores de topoisomerasa II, *ellipticina*, *m-AMSA*, *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes (5 días postnatales). Para ello las mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de rata de 5 días postnatales se incubaron durante 90 minutos con DMEM conteniendo 4 $\mu\text{Ci/ml}$ [metil- ^3H] timidina y diferentes concentraciones de *menadiona* (1-200 μM), *ellipticina* (1-100 μM) y *m-AMSA* (0.1-50 μM).

El mayor efecto inhibitorio se obtuvo con *menadiona*, la cual disminuyó la síntesis de ADN en corteza de cerebro de rata joven (5 días postnatales) de manera concentración-dependiente alcanzando el máximo de inhibición (aprox. 80%) en la concentración 50 μM . *ellipticina* y *m-AMSA* mostraron un efecto inhibitorio menor llegando a disminuir la síntesis de ADN en un máximo de aproximadamente 50 % y 30 % en las concentraciones 100 μM y 10 μM respectivamente (Fig.3.1).

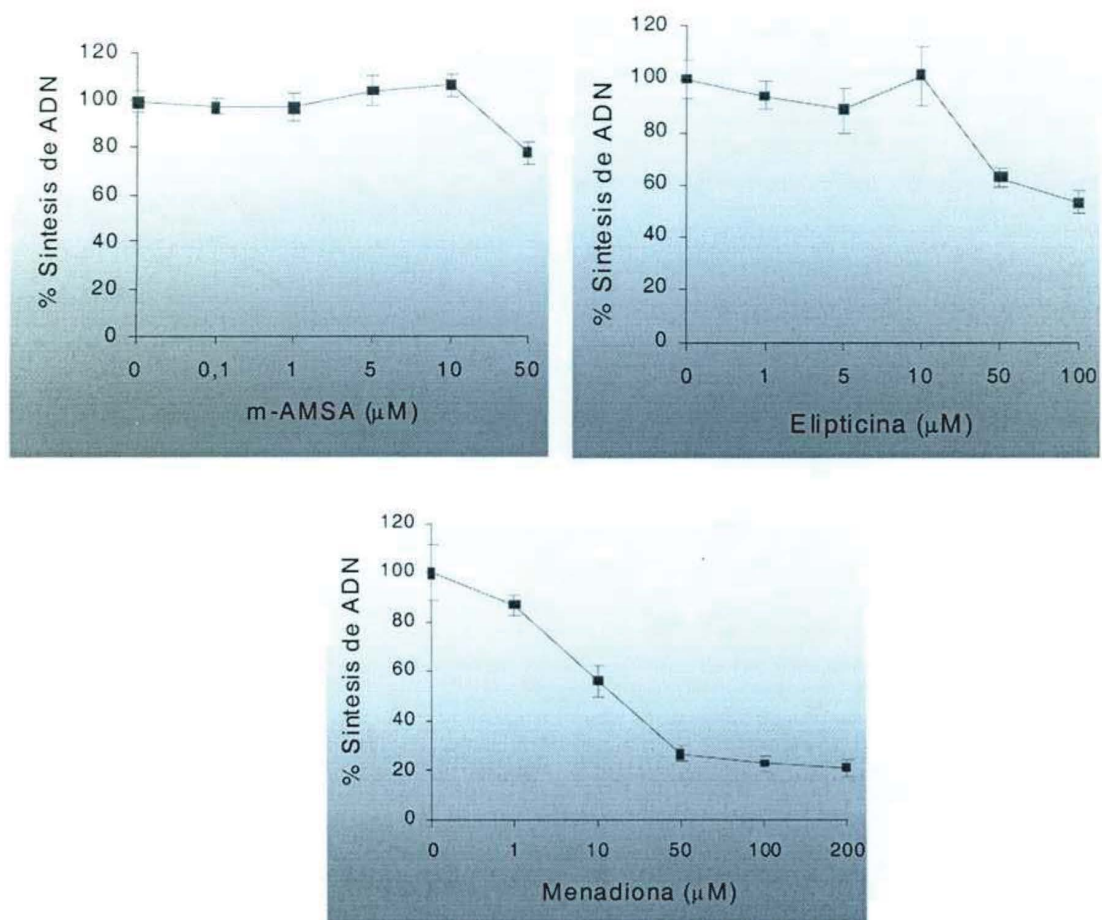


Fig. 3.1. *Efecto de inhibidores de topoisomerasas sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata de 5 días posnatales.* Las mini-unidades se incubaron con DMEM + 4 μC de ³H-metil-timidina y las concentraciones indicadas de *m-AMSA*, *ellipticina* o *menadiona* durante 90 minutos. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,2 % v/v). Cada punto es la media±SEM de tres experimentos independientes realizados por cuatriplicado.

3.2. Efecto temporal de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes

Mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de rata de 5 días postnatales se incubaron con DMEM + 4 μCi de [^3H -metil]-timidina y *menadiona* (50 μM) o 0,1% DMSO (control) durante 30, 60 y 90 minutos. Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio de la *menadiona* (50 μM) ocurre dentro de los 30 minutos y el efecto es máximo a los 90 minutos. (Fig. 3.2).

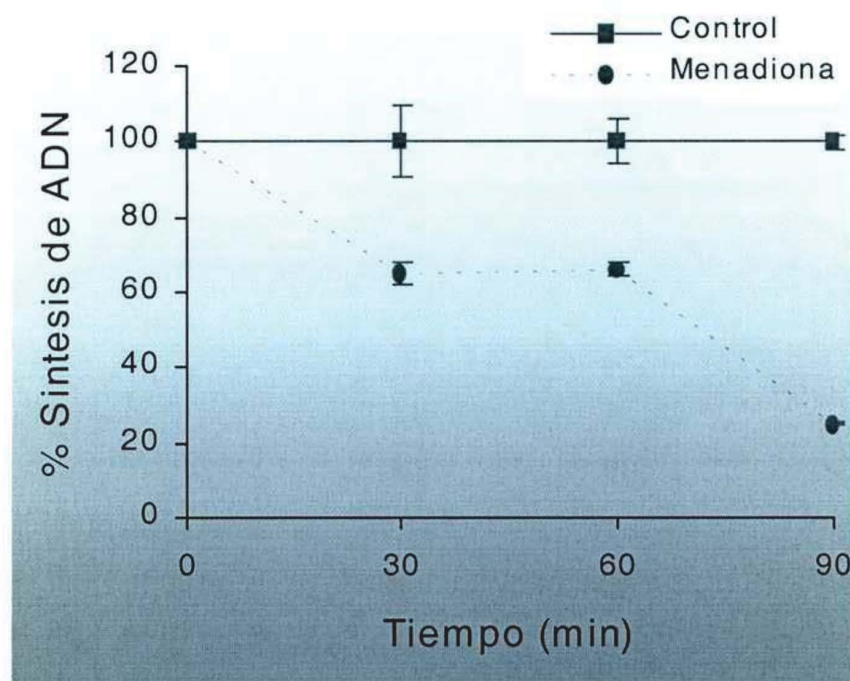


Fig. 3.2. Efecto temporal de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes. Las mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de rata de 5 días postnatales se incubaron con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina + *menadiona* (50 μM) durante 30, 60 y 90 minutos. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,1 % v/v). Cada punto es la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

3.3. Efectos de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas adultas

Las mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de ratas de 90 días postnatales. fueron incubadas con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina + 50 μM *menadiona* (M) o 0,1 % v/v DMSO (C) durante 90 minutos.

Los resultados mostraron que la *menadiona* (50 μM) no produjo cambios significativos en la síntesis de ADN (Fig. 3.3).

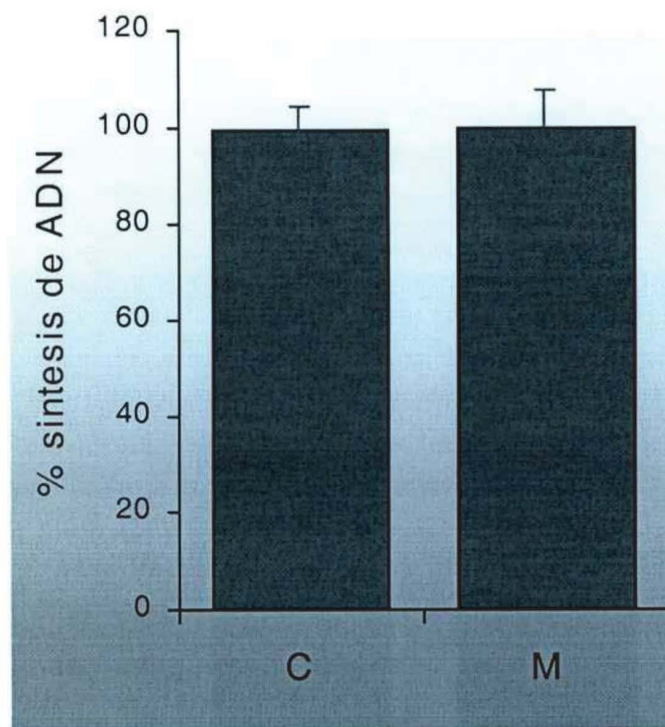


Fig. 3.3. Efecto de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata de 90 días postnatales. Las mini-unidades se incubaron con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina + *menadiona* (50 μM) durante 90 minutos. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,1 % v/v). Cada punto es la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

3.4. Efecto de la *menadiona* sobre la captación de [³H-metil]-timidina en corteza cerebral de ratas jóvenes

A fin de descartar la posibilidad de que el efecto inhibitorio de la menadiona fuese debido a una disminución de la captación del precursor radiactivo previo a la síntesis de ADN se estudió el efecto de la droga sobre la captación de [³H-metil]-timidina. Para ello, las mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de ratas de 5 días postnatales fueron incubadas con DMEM + 4 µCi/ml de [³H-metil]-timidina y 50 µM *menadiona* (M) o 0,1 % v/v DMSO (C) durante 15 minutos. Luego se midió la incorporación de de [³H-metil]-timidina total (incorporado al ADN + libre) dentro de las células.

Los resultados mostraron que la *menadiona* no inhibió la captación de [³H-metil]-timidina (Fig. 3.4).

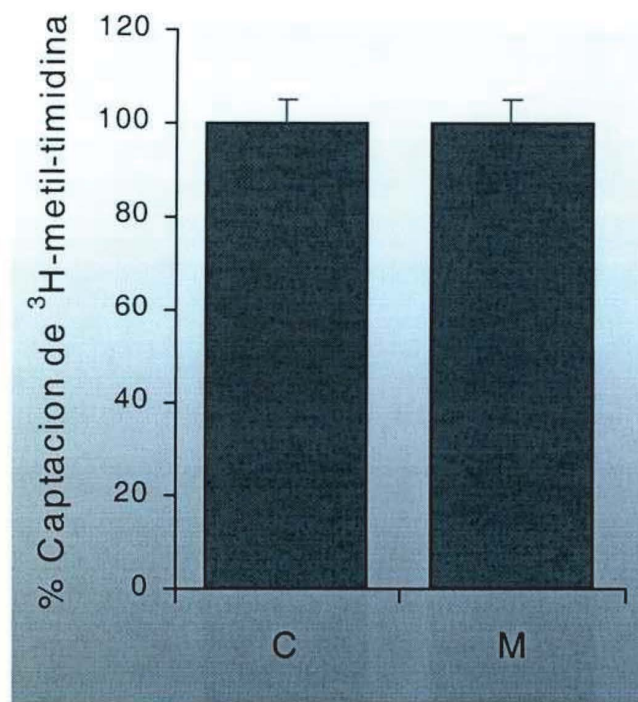


Fig. 3.4. Efecto de la menadiona sobre la captación de [³H-metil]-timidina en corteza cerebral de rata de 5 días postnatales. Las mini-unidades fueron incubadas con DMEM + 4 μ Ci/ml de [³H-metil]-timidina + menadiona (50 μ M) durante 15 minutos y se determinó la cantidad total de [³H-metil]-timidina captada por las mini-unidades. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,1 % v/v). Cada punto es la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

3.5. Efecto de la *N-etil-maleimida* (NEM) sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes

Se estudió el efecto de *N-etil-maleimida*, un agente bloqueante de grupos tioles, sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes. Para ello, las mini-unidades preparadas a partir de ratas de 5 días postnatales se incubaron con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina y NEM (5 – 500 μM) durante 90 minutos.

Los resultados mostraron una inhibición concentración-dependiente de la síntesis de ADN a partir de NEM 50 μM (Fig. 3.5).

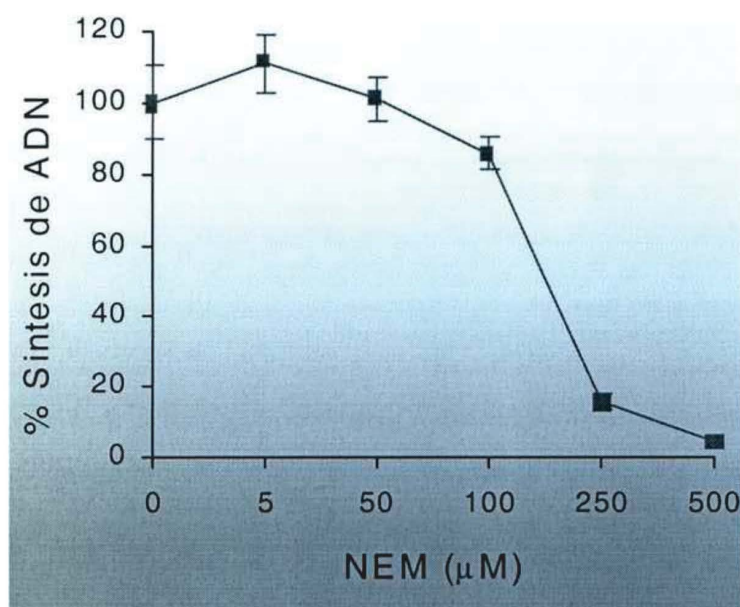


Fig. 3.5. Efecto del NEM sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata de 5 días postnatales. Las mini-unidades fueron incubadas con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina + NEM (5 – 500 μM) durante 90 minutos. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,2 % v/v). Cada punto es la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

3.6. Efecto de *N-etil-maleimida* (NEM) sobre el efecto inhibitorio de la *menadiona*

Para determinar si el efecto tóxico de la *menadiona* se debe a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno por su interacción con tioles, las mini-unidades preparadas a partir de ratas de 5 días postnatales se incubaron con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -metil-timidina y 50 μM de NEM (ya que se observa (Fig. 3.5) que a estas concentraciones de NEM no se afecta la proliferación del tejido) o diferentes combinaciones de NEM + *menadiona* o *menadiona* sola.

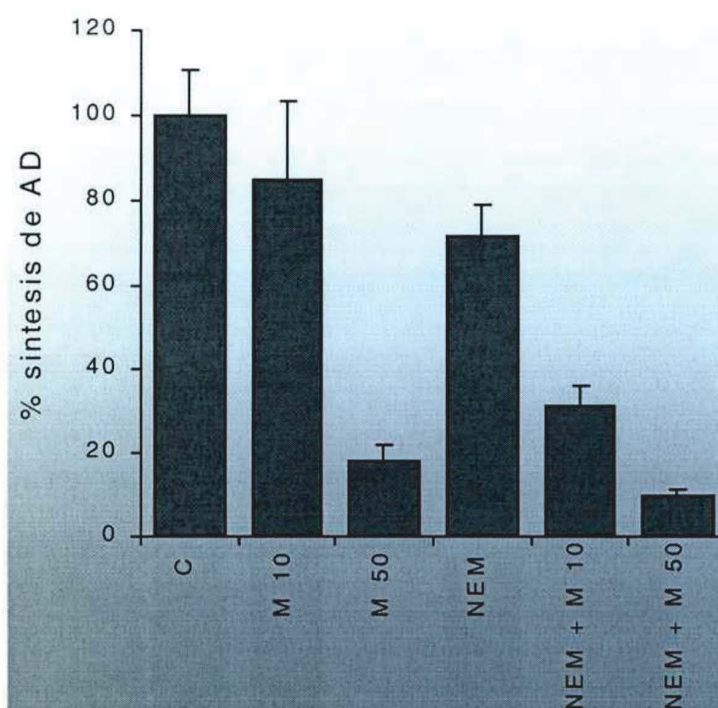


Fig. 3.6. Efecto del NEM sobre el efecto inhibitorio de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata de 5 días posnatales. Las mini-unidades se incubaron con DMEM conteniendo 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina + 0,2 % v/v DMSO (C), 10 μM *menadiona* (M 10), 50 μM *menadiona* (M 50), 50 μM NEM (NEM), 50 μM NEM + 10 μM *menadiona* (NEM + M10) o 50 μM NEM + 50 μM *menadiona* (NEM + M 50) durante 90 minutos. Cada barra representa la media de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

Los resultados mostraron que el co-tratamiento de las mini-unidades con NEM + *menadiona* produjo un efecto sinérgico en la inhibición de la síntesis de ADN (Fig. 3.6).

3.7. Efecto irreversible de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas jóvenes

Mini-unidades preparadas a partir de ratas de 5 días posnatales se incubaron con DMSO solo (C) o *menadiona* 50 μ M (M) por 60 minutos con DMEM + 4 μ Ci/ml de [3 H-metil]-timidina (columnas claras) o sin [3 H-metil]-timidina (columnas oscuras). Luego de la incubación, las muestras se procesaron para medición de [3 H-metil]-timidina incorporada al ADN (columnas claras) o se lavaron, se incubaron con DMEM por 30 minutos y con DMEM + 4 μ Ci/ml de [3 H-metil]-timidina por 60 minutos y se determinó la incorporación de [3 H-metil]-timidina al ADN (columnas oscuras).

A los 60 minutos de incubación con *menadiona* (50 μ M) se observó un fuerte efecto inhibitorio en la síntesis de ADN (~83%). Sin embargo, cuando se removió la droga no se observó un aumento en la incorporación del precursor radioactivo cuando se comparó con el método original (Fig. 3.7) demostrando que el efecto de la *menadiona* 50 μ M fue irreversible en el período de tiempo estudiado.

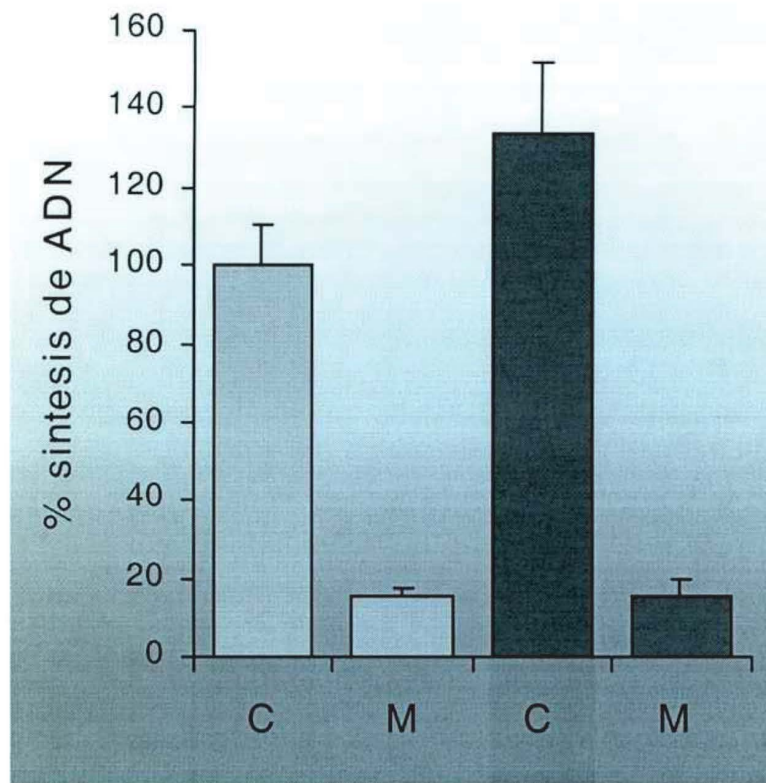


Fig. 3.7. Efecto irreversible de la menadiona sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de 5 días postnatales. Las mini-unidades se incubaron con DMSO solo (C) o menadiona 50 μ M (M) por 60 minutos con DMEM + 4 μ Ci/ml de [³H-metil]-timidina (columnas claras) o sin [³H-metil]-timidina (columnas oscuras). Luego de la incubación, las muestras se procesaron para medición de [³H-metil]-timidina incorporada al ADN (columnas claras) o se lavaron, se incubaron con DMEM por 30 min y con DMEM + 4 μ Ci/ml de [³H-metil]-timidina por 60 minutos y se determinó la incorporación de [³H-metil]-timidina al ADN (columnas oscuras). Cada barra representa la media \pm SEM. de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

Por otra parte, este experimento indica que la viabilidad celular no se ve afectada durante el ensayo ya que los valores netos de incorporación del precursor radioactivo de los controles sin droga no son esencialmente idénticos.

3.8. Efecto de la *menadiona* sobre la síntesis de proteínas en corteza cerebral de ratas jóvenes

Las mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de ratas de 5 días postnatales se incubaron con DMEM + 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-[4,5- ^3H]leucina y *menadiona* (1 – 100 μM) o 0,1 % v/v DMSO (C) durante 90 minutos.

Los resultados mostraron que la *menadiona* inhibió la síntesis de proteínas de una manera concentración-dependiente (Fig. 3.8).

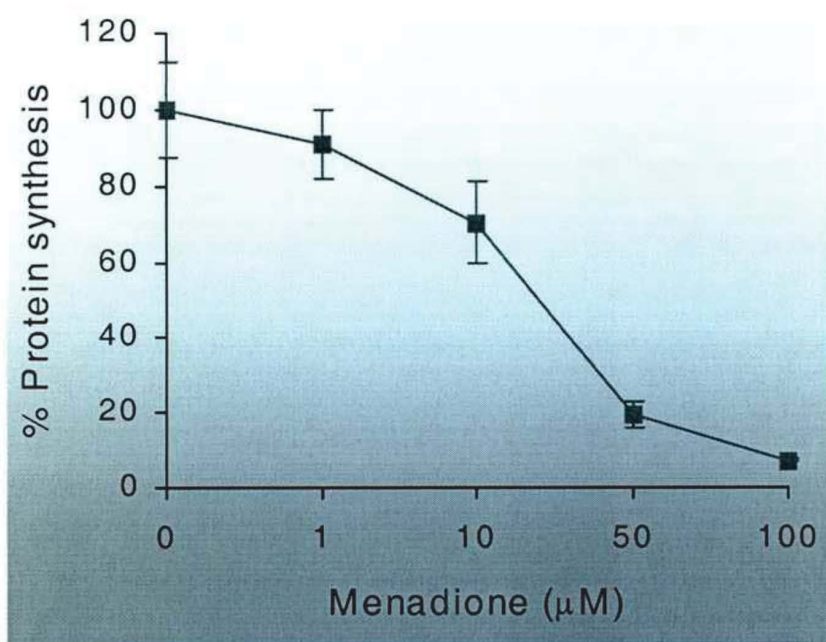


Fig. 3.8. Efecto de la *menadiona* sobre la síntesis de proteínas en corteza cerebral de rata de 5 días postnatales. Las mini-unidades se incubaron con MEM + 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-[4,5- ^3H]leucina + *menadiona* (1- 100 μM) durante 90 minutos. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,1 % v/v). Cada punto es la media \pm SEM. de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

3.9. Efecto de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN asociada a procesos reparativos en corteza cerebral de ratas adultas

La síntesis de ADN en las células es requerida para mecanismos de replicación y reparación del ADN. La síntesis de ADN asociada a procesos reparativos se mide generalmente como UDS (unscheduled DNA synthesis) (Schmitz y col. 1999) por diferentes métodos (autoradiografía, tinción enzimática de 5-bromo-2'-deoxiuridina y conteo con líquido de centelleo) con sensibilidad similar (Sawada y col. 1995). UDS corresponde al daño del ADN y reparación por medio de escisión como se ha demostrado en una variedad de tejidos y líneas celulares (Heyting y van't Veer. 1981, Painter y Cleaver. 1969). El uso de cultivos en los cuales la síntesis de ADN se bloquea por *hidroxiurea* (la cual inhibe la reparación pero no la replicación) junto con cultivos que no son bloqueados permite una estimación del efecto de agentes químicos en ambos tipos de síntesis de ADN (Agrelo y Severn. 1981). En mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de rata de 5-12 días postnatales, la *hidroxiurea* (10 mM) inhibe la síntesis de ADN hasta un 95-97 %, mientras que en corteza de rata adulta no inhibe mas de un 40 % (Yakisich et al. Submitted). Esto coincide con datos obtenidos *in vivo* (Vilenchik y Tretjak 1977) e indica que el sistema de mini-unidades permite estudiar RDS y UDS.

Las mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de ratas de 90 días postnatales. fueron incubadas con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H -metil]-timidina + menadiona 50 μM (M) o *hidroxiurea* 10 mM (HU), o menadiona 50 μM + *hidroxiurea* 10 mM (M+HU), o 0,1 % v/v DMSO (C) durante 90 minutos.

Los resultados mostraron que el efecto de la *menadiona* no se ve modificado por la presencia de *hidroxiurea* (Fig. 3.9).

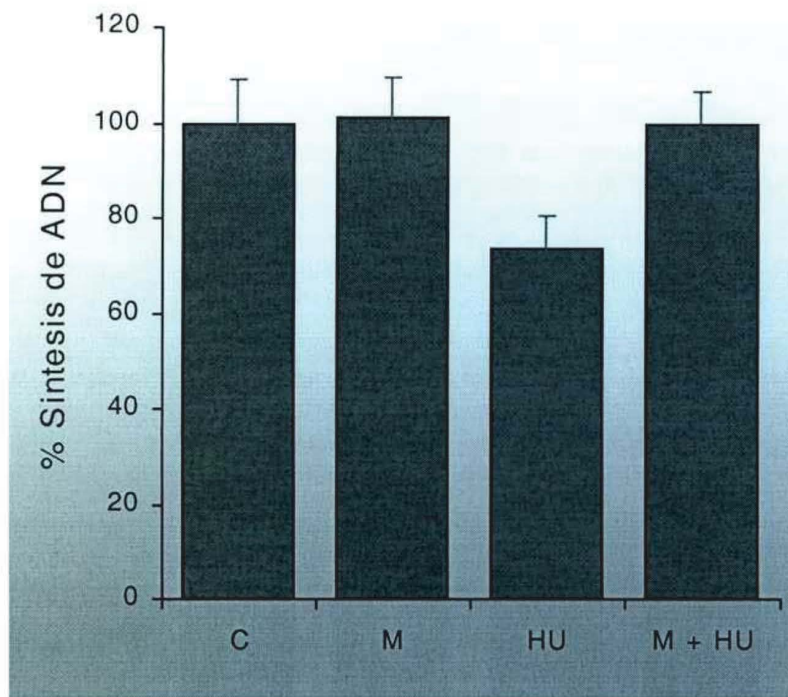


Fig. 3.9. Efecto de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN asociada a procesos reparativos en corteza cerebral de ratas adultas. Las mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de ratas de 90 días postnatales. Se incubaron con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H -metil]-timidina + *menadiona* 50 μM (M) o *hidroxihurea* 10 mM (HU), o *menadiona* 50 μM + *hidroxihurea* 10 mM (M+HU), o 0,1 % v/v DMSO (C) durante 90 minutos. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,1 % v/v). Cada punto es la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

3.10. Efectos del *m*-AMSA, *ellipticina* y *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de ratas adultas.

Mini-unidades preparadas a partir de corteza cerebral de rata de 90 días posnatales se incubaron con DMEM + 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H -metil]-timidina y las

concentraciones indicadas de *m*-AMSA, *ellipticina*, o *menadiona* durante 90 minutos.

Los resultados mostraron que de las tres drogas ensayadas la *menadiona* no produjo ningun efecto significativo mientras que la *ellipticina* y el *m*-AMSA produjeron una pequeño aumento de la síntesis de ADN, siendo el *m*-AMSA el más potente (Fig. 3.10.).

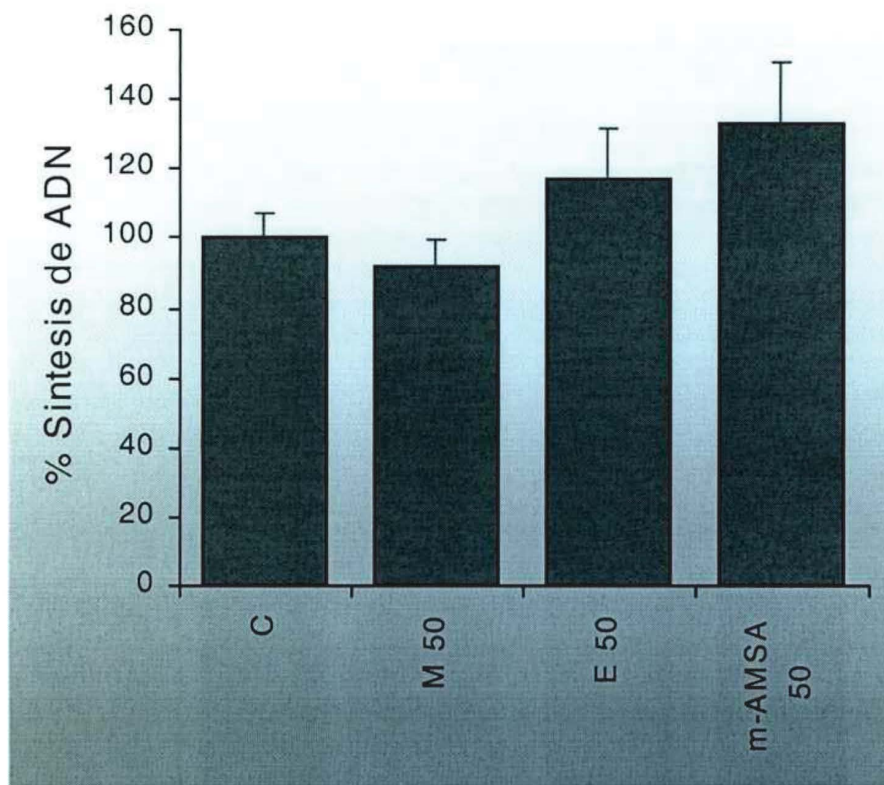


Fig. 3.10. Efecto de inhibidores de topoisomerasas sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata de 5 días posnatales. Las mini-unidades fueron incubadas con DMEM + 4 μ C de 3 H-metil-timidina + las concentraciones indicadas de *m*-AMSA, *ellipticina* o *menadiona* durante 90 minutos. Como control se utilizó DMSO en concentraciones equivalentes (0,2 % v/v). Cada punto es la media \pm SEM. de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

4. DISCUSION

4.1. Proliferación celular en la corteza cerebral de rata.

La velocidad de síntesis de ADN en las células eucariotas depende de un conjunto de señales intra y extracelulares. La preservación de estas señales y de la respuesta celular correspondiente son requerimientos necesarios para el estudio de los mecanismos y regulación de la síntesis de ADN. Las líneas celulares no preservan estas interacciones que ocurren *in vivo* (en el tejido intacto), especialmente en tejidos con interacciones celulares complejas, como la corteza cerebral. Por ejemplo, durante el desarrollo de la corteza cerebral, existe una disminución general de la velocidad de proliferación (Altman y Das 1966) y de la síntesis de ADN (Sung 1969), sin embargo, en cultivos de astrocitos aislados de cerebros de ratas recién nacidas y de ratas adultas la cinética de proliferación fue esencialmente idéntica (Li y col. 1996). Esto indica que las características proliferativas del tejido *in vivo* no se mantuvieron en los cultivos.

Recientemente en nuestro laboratorio se desarrolló un nuevo método basado en la generación de mini-unidades de tejido de corteza cerebral de rata y tiempos cortos de incubación con [³H-metil-]-timidina (Yakisich y col. 1998). Debido a que la incorporación del precursor radioactivo en el ADN se inicia dentro de los 15 minutos después de sacrificar al animal, el método preserva las características metabólicas y proliferativas del tejido *in vivo* (Yakisich y col. 1998, Yakisich y col. 1999).

Utilizando técnicas de autoradiografía en cortes de cerebro de rata luego de una inyección intraperitoneal de [³H-metil]-timidina se demostró que durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatales, la velocidad de proliferación es alta y va declinando progresivamente hasta alcanzar un plateau aproximadamente a los treinta días (Altman y Das 1966). Además, la velocidad de síntesis de ADN, medida en homogenatos de cerebro también declina progresivamente durante el primer mes (Sung 1969). La velocidad de síntesis de ADN medida mediante el sistema de mini-unidades empleado en este trabajo se correlaciona con los datos obtenidos *in vivo* (Yakisich y col. 1998).

Utilizando hidroxiaurea, una droga que sólo inhibe la síntesis de ADN conectada con procesos replicativos y no tiene ningún efecto sobre la síntesis de ADN conectada con procesos reparativos, se determinó que en la corteza cerebral de rata la fracción de síntesis de ADN destinada a procesos replicativos (replicative DNA synthesis; RDS) y la fracción de ADN destinada a procesos reparativos (Unscheduled DNA synthesis; UDS) también varían durante el desarrollo. En ratas recién nacidas, hasta el 90 % de la síntesis de ADN es para procesos replicativos (ya que es inhibida por hidroxiaurea), mientras que en ratas adultas (≥ 60 días posnatales) hasta un 60 % de la síntesis de ADN es para procesos reparativos (ya que no es inhibida por hidroxiaurea) (Vilenchik y Tretjak 1977).

Estas características hacen que la corteza cerebral de rata durante el primer mes de desarrollo postnatal constituya un excelente modelo para estudiar la síntesis de ADN ya sea asociada a procesos replicativos como reparativos, control de la replicación del ADN por medio de fosforilación de proteínas, testeo de drogas que inhiban la síntesis de ADN, etc.

4.2. La barrera hematoencefálica y su importancia en el tratamiento de enfermedades del SNC

El cerebro y la médula espinal de los vertebrados, a diferencia de otros órganos, están protegidos de la sangre por la llamada *barrera hematoencefálica* (BBB) que separa la sangre circulante del líquido intersticial en el cerebro y la médula. Las bases anatómicas de la BBB reside en la pared endotelial de la microvasculatura del cerebro que elimina los poros en la pared de los capilares que se encuentran normalmente en los otros tejidos periféricos. Los rasgos especiales de los capilares cerebrales son : a) uniones estrechas simil epitelio de alta resistencia, b) mínima pinocitosis endotelial y c) recubrimiento del 99 % de la superficie del endotelio por procesos astrocíticos (Pardridge1988).

La permeabilidad de la barrera provee un sistema para preservar la homeostásis en el sistema nervioso facilitando la entrada de metabolitos necesarios y bloqueando la entrada o facilitando la remoción de metabolitos innecesarios o sustancias tóxicas. No sólo se limita el pasaje de macromoléculas sino que también existe selectividad para el pasaje de pequeñas moléculas cargadas (neurotransmisores, sus precursores y metabolitos, y algunas drogas).

Para cualquier metabolito, la eficacia de la exclusión o el transporte está determinada por características morfológicas y funcionales de los capilares cerebrales y por características bioquímicas y biofísicas de la sustancia. En este sentido, las drogas estudiadas se eligieron por ser de bajo peso molecular, altamente liposolubles y poco cargadas, debido a que estas características son esenciales para que las drogas atraviesen la barrera hematoencefálica (Pardridge 1998).

4.3. Efectos de la menadiona sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata en desarrollo.

La *menadiona* (2-methyl-1,4 naphthoquinona: vitamina K₃) se utiliza ampliamente como agente terapéutico para la hipotrombinemia y el cáncer. La *menadiona* a concentraciones micromolares inhibe el crecimiento de células tumorales de mamíferos en cultivo incluyendo células de neuroblastoma de ratón y células de glioma de ratas (Prasad y col. 1981).

La *menadiona* también es un inhibidor de la topoisomerasa II (Chen y Liu 1994). Las topoisomerasas son enzimas claves de la maquinaria de replicación del ADN (Wang 1996) y son el blanco celular primario de muchos agentes antineoplásicos efectivos ampliamente usados (Hande 1998).

Los resultados del presente trabajo demuestran que la *menadiona*, a diferencia de los otros dos agentes probados, es un potente inhibidor de la síntesis de ADN asociada a procesos replicativos, debido a que inhibe fuertemente la síntesis de ADN en la corteza cerebral de ratas jóvenes (IC₅₀~20) y no tiene efecto aparente en la corteza cerebral de rata adulta, donde la proliferación es baja y la síntesis de ADN medida con el presente método es de aproximadamente un 80% más baja (Yakisich y col. 1998).

La respuesta celular a agentes quimioterapéuticos depende del transporte y retención de la droga. Los agentes antitumorales efectivos son los que, transportados pasiva o activamente, quedan retenidas en la célula y no son expulsados al exterior de la misma. La captación de la droga y su retención son variables en las poblaciones de células tumorales ya que éstas son heterogéneas, por lo tanto existe una potencial emergencia de células que son resistentes a la droga (Sailer y col. 1997). En este sentido, la inhibición de la

síntesis de ADN mediada por la *menadiona* no se debió a una disminución en la captación del precursor radioactivo.

La acción de la *menadiona* fue rápida ya que a los 30 minutos de incubación ya se observó el 40 % de inhibición de la síntesis de ADN. Este porcentaje fue aumentando hasta alcanzar el máximo a los 90 minutos. Por otra parte, el efecto temporal de *menadiona* sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata joven fue similar al producido por *etopósido* (un inhibidor específico de la topoisomerasa II usado en la clínica) y *camptotesina* (inhibidor específico de topoisomerasa I) reportados en trabajos previos (Yakisich y col. 1999).

Los efectos citotóxicos de la *menadiona* en varios tejidos normales y en células sanguíneas como eritrocitos, plaquetas, neutrófilos son ampliamente conocidos (Chung 1999) y limitan el uso terapéutico para el tratamiento del cáncer. Existen evidencias de que el efecto tóxico podría ser mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno (Susuki 1999), probablemente mediado por reacciones no enzimáticas de grupos tioles de proteínas en plasma con la *menadiona* (Chung 1999). Consistente con esta hipótesis, NEM suprime la generación de especies reactivas de oxígeno inducidas por *menadiona* y la citotoxicidad de la *menadiona* sobre las plaquetas (Chung 1999).

Nuestros resultados muestran que el efecto inhibitorio de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN fue mediado por un mecanismo independiente de la formación de especies reactivas de oxígeno (probablemente por inhibición de topoisomerasas). En este sentido, nuestro sistema de incubación fue libre de plasma, con lo que se esperaría que la generación de especies reactivas de oxígeno sea debida solamente a la presencia de grupos tioles intracelulares.

Además, la figura 3.6. muestra que NEM (agente bloqueante de grupos tioles) no revirtió el efecto inhibitorio de la síntesis de ADN producido por la *menadiona* sino que por el contrario, lo potenció, sugiriendo que la generación intracelular de especies reactiva de oxígeno es baja y/o no contribuye al efecto inhibitorio temprano producido por *menadiona*. El efecto de NEM fue el opuesto al esperado si la *menadiona* aumentara la generación de ROS a través de la reacción con los tioles. Por el contrario, esto fue consistente con una inhibición sinérgica de la topoisomerasa II vía disminución del nivel de tioles, ya NEM solo en altas concentraciones también inhibió la síntesis de ADN (fig.3.5). Estos mismos resultados fueron reportados por Buckman y col. (Buckman y col. 1993).

El efecto inhibitorio de *menadiona* fue irreversible (fig. 3.7). Desde el punto de vista terapéutico, la relevancia clínica de esta observación es que la *menadiona* no tiene la necesidad de estar presente continuamente en el sistema para inhibir efectivamente la síntesis de ADN.

Finalmente, es improbable que la inhibición temprana del ADN por la *menadiona* sea producida por la inhibición de la unión del EGF a su receptor (EGF-R). Se sabe que la unión del EGF al EGF-R induce una respuesta mitogénica temprana pero la iniciación de la síntesis del ADN es un evento tardío que ocurre luego de 10-15 hrs (Rozengurt 1986, Simn *et al.* 1998). Por lo tanto, se podría anticipar un retardo considerable antes de la caída en la síntesis de ADN luego de la inhibición de la unión del EGF a su receptor.

4.4. Efecto de la *menadiona* sobre la síntesis de ADN asociada a procesos reparativos (UDS).

Como se mencionó anteriormente, la *menadiona* no mostró ningún efecto inhibitorio sobre la síntesis de ADN en corteza cerebral de rata adulta. Tampoco se observó ninguna modificación por el co-tratamiento con *hidroxiurea*, concluyendo que la *menadiona* podría estimular, en parte, la reparación del ácido nucleico, esto se condice con el hecho de que los inhibidores de topoisomerasas al formar los complejos clivables estimulan la reparación del ADN, pero a pesar de esto el efecto es menor que el obtenido con *ellipticina* y *m-AMSA* (fig. 3.10).

4.5. Potencial uso clínico de la *menadiona*

La baja tasa de sobrevida de los pacientes portadores de gliomas, a pesar de las diferentes modalidades terapéuticas para el tratamiento de los tumores malignos del Sistema Nervioso Central, requiere la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Cualquier droga que bloquee la síntesis de ADN en células proliferativas es un candidato potencial para su uso en la terapia contra el cáncer.

Los inhibidores de topoisomerasas son drogas antineoplásicas efectivas (Hande y col. 1998), pero su uso para el tratamiento de tumores de cerebro es limitado en parte por la presencia de la barrera hematoencefálica que limita la cantidad de droga que llega al sistema nervioso central. Por ejemplo, la concentración de *etopósido* en tumores de cerebro malignos luego de la administración intravenosa u oral fue aproximadamente un 14 % del nivel

determinado en plasma (Kiya, 1992). Recientemente, se reportó que la administración de *etopósido* o *m-AMSA* en combinación con terapia de rescate con ICRF-187 permite un aumento en la dosis alcanzada en SNC de estas drogas resultando en un aumento en la sobrevida de los animales portadores de un modelo experimental de gliomas que llevan los gliomas malignos (Holm, 1996; Jensen, 1997). Los datos mencionados anteriormente sugieren que los inhibidores de topoisomerasas podrían ser útiles para el tratamiento de pacientes que tienen tumores de cerebro si se logran las concentraciones terapéuticas.

Se requieren estudios adicionales para elucidar 1) el efecto de la *menadiona* con o sin NEM sobre la síntesis de ADN tanto en tejido normal como en tejido tumoral, 2) la toxicidad en otros tejidos, a fin de determinar el potencial uso clínico de estas drogas solas o en combinación con terapia de rescate para el tratamiento de tumores de cerebro.


H. CARMINATTI


MARIELA FERNANDA JITA

♠ A mis padres principalmente, porque les debo todo lo que soy, por apoyarme en todas mis desiciones, por bancarme siempre, por todo.

♠ A mis hermanas por compartir todo, por estar conmigo, por ser incondicionales.

♠ A Nico, Leo y Vicky por hacer que las cosas sean más lindas, por alegrarme en los momentos más difíciles.

♠ A Geno, Silvia, Carlos y el resto de mi familia.

♠ A Lucas por ayudarme en los últimos detalles de la tesis.

♠ A mis amigos: Ale, Laura, Marce, Lili, María José, Andrea, Fer, Paulita, Esteban, José, Mara y los que me olvido por acompañarme todo este tiempo.

♠ A mis compañeros de trabajo: Billy, Martín, Marieta, Liliana, Andrea, Roxana, Seba, Paulita, entre otros porque hacen que este ámbito no sólo sea un lugar de trabajo, por la paciencia que me tienen y por la ayuda que me brindan.

♠ A Sebastián por toda la ayuda incondicional que me brindó desde que empecé y por su activa colaboración en la dirección de este trabajo.

♠ A Pablo por ayudarme con el Lowry.

♠ Al Dr. Héctor Carminatti y al Dr. Victor Idoyaga por brindarme el espacio y la libertad para trabajar.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agrelo, C.E., and Severn, B.J. 1981. A simplified method for measuring scheduled and unscheduled DNA synthesis in human fibroblasts. *Toxicology* 21:151-158.

Alperin, D.M., Idoyaga-Vargas, V.P., and Carminatti, H. 1986. Rate of protein glycosylation in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 47:355-362.

Altman, J., and Das, G.D. 1966. Autoradiographic and histopathological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126:337-390.

Burden, D.A., and Osheroff, N. 1998. Mechanism of action of eucaryotic topoisomerase II and drugas targeted to the enzyme. *Biochimi. Biophys Acta* 1400:139-154.

Burger, P.C., and Green, S.B. 1987. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 59:1617-1625.

Chen, A.Y., and Liu, L.F. 1992. Menadione (vitamine K₃) induce topoisomerase II mediated cleavage. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 33:2588.

Chen, A.Y., and Liu, L.F. 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:191-218.

Chung, S.-H., Chung, S.-M., Lee, J.-Y., Kim, S.-R., Park, K.-S., and Chung, J.-H. 1999. The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. *FEBS Letters* 449:235-240.

Davis, F.G., Freels, S., Grutsch, J., Barlas, S., and Brem, S. 1998. Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973-1991. *J Neurosurg* 88:1-10.

Deen, F.D., Chiarodo, A., Grimm, E.A., Flke, J.R., Israel, M.A., Kun, L.E., and al, e. 1993. Brain tumor working group report on the 9th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. *J Neurooncol* 16:243-272.

Hande, K.R. 1998. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400:173-184.

Heyting, C., and van't Veer, L. 1981. Repair of ethylnitrosourea-induced DNA damage in the newborn rat. II. Localization of unscheduled DNA synthesis in the developing rat brain. *Carcinogenesis* 2:1171-1180.

Holm, B., Jensen, P.B., and Schested, M. 1996. ICRF-187 rescue in etoposide treatment in vivo. A model targeting high-dose topoisomerase II poison to CNS tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38:203-209.

Jensen, P.B., and Schested, M. 1997. DNA topoisomerase II rescue by catalytic inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 54:755-759.

Jung, S., Rutka, J.T., and Hinek, A. 1998. Tropoelastin and elastin degradation products promote proliferation of human astrocytoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:439-448.

Kiya, K., Unzumi, T., Ogasawara, H., Sugiyama, K., Hotta, T., Mikami, T., and Kurisu, K. 1992. Penetration of etoposide into human malignant brain tumors after intravenous and oral administration. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 29:339-342.

Kleihues, P., Burger, P.C., and Scheithauer, B.W. 1993. Histological typing of tumors of the central nervous system (ed) Springer-Verlag, Berlin.

Labarca, C., and Paigen, K. 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102:344-352.

Li, V., Kelly, K., Schrot, T., and Langan, T.J. 1996. Cell cycle kinetics and commitment in newborn, adult, and tumoral astrocytes. *Dev. Brain Res.* 96:138-147.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Painter, R.B., and Cleaver, J.E. 1969. Repair replication, unscheduled DNA synthesis, and the repair of mammalian DNA. *Radiat Res* 37:451-466.

Pardridge, W.M. 1998. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *J. Neurochem.* 70:1781-1792.

Prasad, K.N., Edward-Prasad, J., and Sakamoto, A. 1981. Vitamin K₃ (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture. *Life Sciences* 29:1387-1392.

Rozengurt, E. 1986. Early signals in the mitogenic response. *Science* 234:161-166.

Sawada, S., Asakura, S., Daimon, H., and Furihata, C. 1995. Comparison of autoradiography, liquid scintillation counting and immunoenzymatic staining of 5-bromo-2'deoxyuridine for measurement of unscheduled DNA synthesis and replicative DNA synthesis in rat liver. *Mutat. Res* 344:109-116.

Schmitz, C., Axmacher, B., Zunker, U., and Korr, H. 1999. Age-related changes of DNA repair and mitochondrial DNA synthesis in the mouse brain. *Acta Neuropathol* 97:71-81.

Simn, A., Hoppe, V., Karbach, D., Leicht, M., Fenn, A., and Hoppe, J. 1998. Late signals from the PDGF receptors leading to the activation of the p70^{S6}-kinase are necessary for the transition from G1 to S phase in AKR-2B cells. *Exp Cell Res* 244:379-393.

Sung, S.-C. 1969. DNA synthesis in the developing rat brain. *Can J Biochem* 47:47-50.

Susuki, Y., and Ono, Y. 1999. Involvement of reactive oxygen species produced via ADPH oxidase in tyrosine phosphorylation in human B- and T-lineage lymphoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:262-267.

Wang, J.C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65:635-692.

Vilenchik, M.M., and Tretjak, T.M. 1977. Evidence for unscheduled DNA synthesis in rat brain. *J Neurochem* 29:1159-1161.

Yakisich, J.S., Sidén, Å., Idoyaga Vargas, V., Eneroth, P., and Cruz, M. 1998. Fast and sensitive method for simultaneous measurement of cell proliferation rate and drug sensitivity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 151:194-202.

Yakisich, J.S., Sidén, Å., Idoyaga Vargas, V., Eneroth, P., and Cruz, M. 1999. Early effects of protein kinase modulator on DNA synthesis in rat cerebral cortex. *Exp. Neurol.* In Press.

Yakisich, J.S., Sidén, Å., Idoyaga Vargas, V., Eneroth, P., and Cruz, M. 1999.
Inhibition of DNA synthesis in human gliomas by roscovitine. *NeuroReport*
10:2563-2567.

