

## Tesis Doctoral

# Nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de próstata

Zalazar, Florencia

2015-05-11

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zalazar, Florencia. (2015-05-11). Nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de próstata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zalazar, Florencia. "Nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de próstata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-05-11.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

## Fe de erratas

Tesis Doctoral: “Nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de próstata”

Lic. Florencia Zalazar

**Página 16**, hay un párrafo que se encuentra duplicado. El último párrafo de esa página no debería estar: “*El tumor en **estadio II** aún se encuentra confinado a la glándula prostática [ ...] y calidad de vida del paciente ya que aún no se han identificado o generado tratamiento para este estadio de la enfermedad ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).*”

**Página 45**. Primer párrafo, tercera línea. “.. *sensibiliza las células al tratamiento con inhibidores de olaparib...*” debería decir: “.. *sensibiliza las células al tratamiento con inhibidores de **PARP**...*”

**Página 94**. En el segundo párrafo, en la segunda línea “*drogas como únicos agentes (25µM de olaparib; 1,5 o 5 µM de flavopiridol*”, debería decir: ““*drogas como únicos agentes (25µM de olaparib; **2,5** o 5 µM de flavopiridol*”.

**Página 95**. En el segundo párrafo, en la quinta línea “... *para un subgrupo de pacientes con PCa y deficientes en la expresión de BRCA1.*”, debería decir: “... *para un subgrupo de pacientes con PCa deficientes en la expresión de BRCA1.*”

**Página 97**. En el tercer párrafo, en la segunda línea “... *altas dosis de flavopiridol (10 mkg/día)...*”, debería decir: “... *altas dosis de flavopiridol (10 mg/kg/día)...*”.

**Página 104**. En el primer párrafo dice: “Estos resultados coinciden con los resultados in vitro, en los que en las células PC3 tratadas con flavopiridol se observaba el aumento de muerte celular por apoptosis, y con los resultados in vivo de los grupos tratados con flavopiridol o

paclitaxel donde observábamos un crecimiento tumoral disminuido comparado con el grupo control.” Debería decir: “Estos resultados coinciden con los resultados in vivo de los grupos tratados con flavopiridol o paclitaxel donde observábamos un crecimiento tumoral disminuido comparado con el grupo control.”

**Página 107.** En el primer párrafo, en la tercera línea *“EICPS49 es un candidato más eficaz como agente...”*, debería decir: *“El CPS49 es **el** candidato más eficaz como agente...”*.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

## **“Nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de próstata”**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

**Lic. Florencia Zalazar**

Directora de tesis: **Dra. Adriana De Siervi**

Consejero de Estudios: **Dra. Elba Susana Vazquez**

Laboratorio de Cáncer y Apoptosis, Departamento de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

IQUIBICEN – CONICET

Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos,

IBYME- CONICET

Buenos Aires, 2014

**RESUMEN****NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL CÁNCER DE PRÓSTATA**

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres en la población argentina. El instituto Nacional del Cáncer (USA) describe diferentes tratamientos para los pacientes con PCa: cirugía, radiación y hormono-terapia. Para los pacientes con PCa avanzado, el tratamiento más común es el docetaxel, sin embargo esta terapia no extiende significativamente la sobrevivida de los pacientes. Por lo tanto, es crítico el desarrollo de nuevos agentes y combinaciones para el tratamiento de esta etapa de la enfermedad.

Previamente en estudios *in vitro* se determinó que el compuesto antiangiogénico análogo de la talidomida CPS49, selectivamente elimina a las células de leucemia aumentando las especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la modulación de diversas vías transcripcionales, cuando se lo combina con flavopiridol, un potente inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). En el presente trabajo se investigaron los efectos de nuevos análogos de la talidomida en el PCa. En base a los resultados *in vitro* obtenidos elegimos el CPS49 para combinar con otros agentes y estudiar su capacidad antitumoral. Cuando combinamos CPS49 con flavopiridol observamos que este inhibidor de CDKs aumentó la citotoxicidad del CPS49 en todas las líneas celulares de PCa analizadas. En PC3 observamos que la combinación arrestó el ciclo celular, indujo la apoptosis e inhibió la formación de colonias. Estudios *in vivo* utilizando xenotransplantes generados a partir de la inoculación de células PC3 en ratones nude demostraron que el CPS49 y el flavopiridol disminuyeron el crecimiento tumoral en una concentración efectiva de las drogas cercanas a la mitad de las previamente publicadas. Análisis histológicos de los tumores extraídos mostraron extensas áreas de necrosis inducidas por el tratamiento. Además evaluamos la expresión de 23 genes mediante un arreglo de RT-qPCR en células PC3 expuestas a las drogas y a su combinación y en los tumores de los ratones xenotransplantados, y observamos que el CPS49 junto con el flavopiridol disminuyó la expresión de genes involucrados en adhesión, migración e invasión celular.

Teniendo en cuenta que el paclitaxel es el quimioterapéutico más utilizado actualmente para el tratamiento del PCa avanzado, se analizó el efecto de la combinación del CPS49 con este compuesto. Demostramos que la combinación de bajas dosis de CPS49

aumentó la citotoxicidad producida por paclitaxel en líneas celulares de PCa, aunque esta combinación no redujo el volumen tumoral en los ratones xenotransplantados.

Debido a que las mutaciones en BRCA1 o la disminución de su expresión alteran la sensibilidad a diferentes drogas antitumorales, en este trabajo estudiamos la respuesta al flavopiridol y CPS49 luego de variar los niveles de expresión de BRCA1 en las distintas líneas celulares de PCa. La baja expresión de BRCA1 aumentó la sensibilidad a dicha combinación. Además utilizamos olaparib, un inhibidor de PARP que se usa para el tratamiento del cáncer de mama en pacientes que poseen BRCA1 mutado. Este agente resultó ser selectivo para las líneas celulares de PCa con baja expresión de BRCA1, y aumentó la sensibilidad a flavopiridol y CPS49 en la línea celular PC3.

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral se estudiaron distintas estrategias terapéuticas en ensayos pre-clínicos para el PCa. Aunque las terapias propuestas requieren una profundización del estudio, podemos concluir que la propuesta más completa y prometedora para el tratamiento del PCa es la combinación de CPS49 con flavopiridol.

### **Palabras claves**

CPS49; flavopiridol; paclitaxel; cáncer de próstata; estudios pre-clínicos; xenotransplantes.

**ABSTRACT****NEW THERAPEUTIC STRATEGIES FOR PROSTATE CANCER**

Prostate cancer (PCa) still ranks as the second most frequently cause of men cancer death in Argentina. National Cancer Institute (USA) describes different treatments for PCa: surgery, radiation therapy, hormone therapy, chemotherapy and approved experimental clinical trials. For patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC) the most common treatment is docetaxel chemotherapy. This therapy is only palliative and does not significantly extend the overall survival rate in patients. Thus, there is a need for the discovery of new agents and regimens for this disease.

CPS49, an analog of thalidomide, was reported to selectively kill leukemic cells by increasing intracellular reactive oxygen species (ROS) and further targeting multiple transcriptional pathways, when is co-administrated with flavopiridol, a semisynthetic flavonoid that inhibits cyclin dependent kinases (CDKs). In this work, the effects of new thalidomide analogues in PCa were investigated. Based on the *in vitro* results, CPS49 was chosen to combine with other agents and study its antitumor capacity in PCa. The combination of flavopiridol and CPS49 enhanced CPS49 cytotoxicity in all PCa cell lines analyzed. In PC3 cell line we observed that this combination induced cell cycle arrest, apoptosis and inhibited colony formation. *In vivo* studies using xenograft generated from PC3 cell inoculation in nude mice demonstrated that flavopiridol and CPS49 combination decreased tumor growth using a half effective concentration of drug that was previously published. Histological analysis of xenograft PC3 tumor samples from CPS49/flavo combination showed extensive areas of necrosis induced by the treatment. RT-qPCR array containing 23 genes from PC3 cells or PC3 xenografts exposed to CPS49/flavo combination showed that this treatment shut down the expression of several genes involved in adhesion, migration or invasion.

Given that paclitaxel is the chemotherapeutic treatment most currently used for advanced PCa, the effect of combining paclitaxel with CPS49 was analyzed. We find that the combination of low doses of CPS49 increased cytotoxicity produced by paclitaxel in PCa cell lines, but this combination did not significantly reduce tumor growth in PC3 xenografts.

BRCA1 mutations or its decreased expression modulates sensitivity to various antitumor drugs. In this thesis, we studied the effects of flavopiridol and CPS49 in PCa cell lines

with different BRCA1 expression levels. BRCA1 depletion increased cell sensitivity to this combination.

Furthermore we investigated the effects of olaparib in BRCA1 depleted PCa cell lines. Olaparib is a PARP inhibitor used for the treatment of breast cancer in BRCA1 mutations carrier patients. This agent was found to be selective for BRCA1 depleted PCa cell lines, and increased sensitivity to CPS49/ flavopiridol combination in PC3 cell line.

In summary, in this doctoral thesis, different therapeutic strategies were tested in PCa pre-clinical studies. Although all the proposed therapies require a more detailed study, we can conclude that the most complete and promising therapy assayed for PCa is the combination of CPS49 with flavopiridol.

**Keywords**

CPS49; flavopiridol; paclitaxel; prostate cancer; preclinical studies; xenografts.



Con estas líneas pretendo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, y que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis haya llegado a buen fin. Es por eso que me voy a tomar un tiempo y espacio de la tesis para hacerlo y tratar de poner en palabras lo agradecida que estoy de haber transitado con ustedes esta etapa.

Considero que todo aquel que ha tenido alguna relación conmigo durante el desarrollo de esta tesis merece mi total agradecimiento, ya que estoy segura de que en algún momento ha escuchado estoicamente quejas y lamentaciones, alegrías y satisfacciones.

Quiero comenzar por agradecer a la Dra. Adriana De Siervi por su trabajo en mi proyecto, por su paciencia frente a mis dudas o decepciones, por su apoyo y dirección para salir adelante con cada problema que se iba suscitando. Dirige mis trabajos desde mi Tesina de Licenciatura, por lo que los agradecimientos se extienden a 7 años atrás. Bajo su dirección aprendí a trabajar, a preparar protocolos, a pensar nuevas estrategias, a buscar errores y cambiarlos, a escribir resúmenes, posters, papers, a exponer un trabajo, a discutir resultados, etc. Y en esta última parte del camino recorrido, debo agradecerle muy especialmente por su paciencia e insistencia en la escritura de este trabajo. ¡Terminamos!

En segundo lugar quiero agradecerle a la Dra. Elba Vazquez. Ella nos permitió ser parte de su laboratorio durante muchos años, hasta que nos mudamos al IBYME durante mi último año de beca. Sus palabras siempre fueron de aliento y consejos para seguir adelante más allá de las dificultades, en temas de ciencia y de la vida, mostrándonos con su ejemplo el amor al trabajo. No puedo dejar de agradecer su gran generosidad para que mi proyecto pueda seguir su camino. Y por último agradecer su esfuerzo para que el grupo esté unido y siempre tirando para el mismo lado.

Quisiera ahora tomarme unas líneas para agradecer a mi grupo de trabajo, al *BRCA1 team*. El primer día que entré al laboratorio me propusieron aprender de una grande. Grande en todos los mejores sentidos que pueda tener esa palabra. Y todos los que la conocen dan fe de ello. Me enseñó todo lo que se del laboratorio, y me ayudó en un sin fin de oportunidades, para que yo pudiera terminar. Con ella compartí miles de horas de laboratorio, y cada una de esas horas era puro aprendizaje. Y tantas horas compartidas generaron una amistad hermosa, divertida, compañera que pasó por millones de

momentos complicados y felices de la vida. ¡Qué bueno querida Cuca que el destino nos haya permitido compartir esta etapa! Gracias por tu entrega no solo hacia mí, sino hacia todos los que pasaron por el laboratorio. No puedo dejar de agradecerte por las largas tardes que cuidaste de Luli, comprándole golosinas, inflando guantes y dibujando caritas sobre él para que pudiera terminar con mis experimentos. Gracias Dra. Paola De Luca.

En mis comienzos me crucé también con otro gran compañero, el Dr. Cristian Moiola. Gracias Cris, por todas las veces que me escuchaste, que me aconsejaste, me contagiaste tu serenidad y gracias por bancarnos a las chicas. ¡Eramos cuatro contra uno! Gracias por tus sabios consejos para decidir y para buscar nuevas formas de obtener resultados distintos, gracias por tu amistad.

Y dentro del laboratorio, estaban las Dras. Belén Elguero y Mercedes Ferrando, para los amigos Elguer y Gertru. Ellas, que pertenecían al grupo de los “*Elbos*” fueron grandes compañeras y amigas durante todo mi paso por el laboratorio. Describir la buena onda de siempre, el compañerismo, las ganas de ayudar en todo momento, la confianza, la predisposición, y la amistad que se generó, es difícil. Vivimos juntas momentos difíciles, tensos, de plena alegría, de mucho cansancio donde los chistes y la buena onda permitían seguir adelante y tantas otras situaciones que quedan guardadas en el excelente recuerdo de la etapa del doctorado. Ambas son extraordinarias personas y agradezco haber podido transitar mis años de laboratorio con ustedes.

Ellos, Cuca, Molol, Elguer y gertu, fueron mi soporte en el laboratorio. Muchas veces los becarios nos preguntamos qué es lo más importante que debe tener un laboratorio para que uno lo elija para llevar a cabo su proyecto. Desde mi experiencia, puedo decir que el grupo de trabajo, los compañeros, son sumamente importantes. Cada uno de ellos me ayudó, me aconsejó, me escuchó, me acompañó y me regaló la hermosa oportunidad de poder devolverle estos gestos. Gracias chicos por hacer de mi paso por el doctorado una etapa tan llena de amistad. Gracias por los increíbles SAIC que vivimos. Gracias por el día a día. Gracias por TODO.

Quiero también agradecerle a la Dra. Geraldine Gueron. Gracias a su gran esfuerzo por publicar trabajos, hacer contactos y ser reconocida, consiguió reactivos, equipos, permisos, para muchos de los que compartíamos el laboratorio con ella. Ciertamente sin

su intervención no lo hubiéramos logrado. Agradecerle también por su interés por nuestros avances y por sus consejos para lograr lo que queremos.

Quiero agradecerle especialmente al Dr. Javier Cotignola. Trato de hacer memoria y recordar todas las veces que me dio una mano, y pienso que va a ser difícil numerarlas. Voy a resumirlo pero sé muy bien que no fue resumida su ayuda. Javito, gracias por ser el libro gordo de Petete en muchas situaciones. Gracias por compartir conmigo tu vasta experiencia en PCRs, drogas, páginas de internet para conseguir información, manejo de programas para trabajar como corresponde, etc. Gracias por tus consejos y por las miles de veces que me tuviste que escuchar y te tomaste tu tiempo para dejar lo tuyo y discutir conmigo. Y gracias también porque te bancaste miles de charlas de chicas. Sabemos que te divertías con nuestras anécdotas. Sos una gran persona, un compañero y un admirable investigador.

Quiero agradecer al Dr. Meiss por los análisis histológicos realizados en este trabajo y por tener siempre una mirada positiva frente a los resultados.

Al labo fueron ingresando distintas personas, algunas se fueron, otras quedaron. Todas ellas nos dieron la oportunidad de aprender a compartir, a enseñar y a ser mejores compañeros. Gracias por compartirnos sus proyectos, por interesarse en el mío y por darnos una mano cuando lo necesitamos. Gracias a Ale A, Angie, Feli, Daia (Arrocito), Nico (me reservo el apodo), Ale (Alita), Tefi (Mini Elba) por traerle tanta alegría y aire nuevo al labo.

En el CM1 del Departamento de Química Biológica, hay una característica que reina y es el compañerismo entre los laboratorios. Quiero agradecer a todos los laboratorios que forman parte de este centro por la inmensa ayuda que nos brindaron cuando necesitamos reactivos, aparatos y por compartir con nosotros su vasta experiencia en áreas que no manejábamos todavía. Fue un placer trabajar rodeado de grupos así. Y uno aprende gracias a este valor, que trabajar en grupo, ser compañero, compartir es la mejor forma de trabajar siempre. Gracias al laboratorio de la Dra. Mónica Kotler, al laboratorio de las Dra. Susana Correa y Dra. Mariana Bermudez, al laboratorio de la Dra. Alejandra Guberman, al laboratorio de las Dras. Adalí Pecci y Edith Kordon, al laboratorio de la Dra. Eli Jares y el Dr. Federico Coluccio, al laboratorio de Química

Orgánica, al laboratorio del Dr. Diego Laderach y el Dr. Daniel Compagno, al laboratorio del Dr. Martin Monte y Dr Galigniana.

Acompañando esta característica, no puedo dejar de agradecer la buena onda de cada uno. Más allá de los saludos y el compañerismo, muchos fueron compañeros de tardes de mate, charlas laborales y de la vida, after lab, fiestas. Gracias por prenderse en mis locuras del amigo invisible, en los afer labs y en las salidas en Saic. Sigo agradecida porque no solamente me tocó en suerte un laboratorio hermoso, sino también por la gente con la que me crucé todos los días. Qué lindo fue sentirse tan cómoda y acompañada en el lugar de trabajo. GRACIAS A TODOS. Dra. Sabrina Cardillo, Chino, Cari, Cristian, Noe, Charly, Clau, Ari, Andrés, Paola, Dieguito, Martincito, Naty R., Anita Q., Carolina, Vicky Goddio, Johi, Nadia, Lautaro, Naty F., Anitita, Vicky, Julieta, Julia, Lourdes, Jimena Giudice, Martín, Lucía, Lautaro, Jimenita, Francisco, Dra Alejandra Erlejman, Ale M., Gisela, Fernanda, Fatima y Julieta. Y debo hacer una mención especial para algunas personas con las que compartí un poco más que la buena onda y el compañerismo y que ciertamente se volvieron confidentes durante esta etapa. Gracias Vic Vicky Vic. Gracias Tochina. Gracias Jimenin. Son unas grandes!

Quiero agradecer especialmente a Betina, quién me recibió con una sonrisa y algo para comentar durante muchas mañanas, quién me prestaba la llave del laboratorio las miles de veces que la olvidaba en casa, quien nos lavaba el material y se adaptaba a nuestras necesidades laborales y quién infinitas veces adelantó su trabajo a modo de favor.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el aporte fundamental del Dr. Figg, quién nos facilitó todos los análogos de talidomida y del Dr. Gardner quién nos aportó el flavopiridol. ¡Muchas gracias!

Terminando ya con los agradecimientos del área laboral, quiero agradecer al CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por brindar financiamiento a este trabajo.

Quiero ahora agradecer a mi familia y amigos, quienes son la fuente de amor y alegría de mi vida. Cabe destacar que solamente voy a agradecer lo que respecta a mi etapa en la FCEN, dado que es imposible poder expresar lo agradecida que estoy de tenerlos en mi vida en pocas palabras.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Quiero comenzar con mis padres, Tolito y Alberino, quienes me apoyaron y sostuvieron en todo sentido para que pudiera realizar toda mi aventura académica. Gracias por estar siempre al lado, por enojarse cuando algunos no aceptaban el paper, por aconsejarme a no darme por vencida, por apoyarme en todos mis proyectos nuevos. Por sostenerme con su gran amor. Gracias por todo lo que hicieron para ayudarme con Lu para que yo pueda seguir, en especial a mamá. Vuelvo a repetir lo que dije en los agradecimientos de la tesina de Licenciatura, dejarla en tus manos es la mejor opción. Saberla feliz y contenta de ir a lo de la Toli, me hace sentir menos culpa.

Sigo con mis abuelos, Luisa y Fidel que desde el cielo festejan mi logro. Y mis abuelos Cuqui y Guillo que siguen cerca mío. Gracias por preocuparse por mi trabajo, por interesarse en mi proyecto, por preguntarme cuánto falta, por acompañarme en esta etapa. Gracias por estar.

Gracias a mi familia política, un ensamble divertidísimo, lleno de amor y compañía. Gracias a Orli, Gra, Vicky y Mario por estar atentos, por ser sumamente serviciales, por darse para que podamos cumplir con nuestro trabajo con Fede. Gracias por hacer tan placentera la estadía de Lu con ustedes, por preguntar por esta etapa, por interesarse y acompañarme.

A mis amigas de la vida, Candy, Juli, Vicky, Ceci, Luli y Sole. ¡Gracias! La vida nos mantiene unidas, a pesar de los distintos caminos elegidos. Gracias amigas por escucharme tantas veces, por abrazarme y acompañarme siempre. Gracias por estar pendientes de cómo van las cosas en el labo, gracias por alegrarse por las pequeñas cosas del día a día, como por el otorgamiento de las becas, la finalización de los experimentos, la aceptación del paper. Gracias por siempre tener un ojo tan subjetivo sobre mí que me hace dar cuenta siempre de la gran amistad que nos une. Las adoro.

Y dejando lo más importante para el final, con lo difícil que es expresar en tan poco lugar algo que llena mi alma, quiero agradecerle a Fede y a Lulita. Al compartir la vida con ustedes, se llevan la mejor y la peor parte de toda esta etapa. Quiero agradecerles la paciencia, el soporte y la paz que me brindaron cuando yo no estaba tan bien. También quiero agradecerles por alegrarse conmigo y festejar juntos los logros. Agradecerle a Lu por su infinita plasticidad para divertirse en cualquier lugar que le tocaba estar, como por ejemplo esperando a mamá en el labo, sin tocar nada, jugando con los jueguitos en la

## **AGRADECIMIENTOS**

---

compu, o esperando a que mamá terminara en el labo en las escalinatas de la FCEN con papá mientras merendaban. Gracias por preguntarme sobre mi trabajo, por reconocerlo con alegría y admiración, por hacerme sentir la más grande en mi trabajo, aunque haya infinitos más grandes que yo y muy cerca mío. Te amo Lulina. A Fede debo agradecerle el aguante frente a mis cambios de humor que tenían que ver con el trabajo, mis ausencias o llegadas tardes, el haber aceptado que el jardín de Lucía sea MI Pequeña Ciudad para que ella esté cerca mío con el esfuerzo que implica por la lejanía a nuestras casas, y en particular tengo que agradecerle lo que me insistió por decirlo de una forma educada, para que me siente y escriba la tesis, para que no me distraiga con la primera mosca que vuele, para que escriba y termine esta etapa. Eras la conciencia que yo no quería escuchar, solo que la conciencia es más fácil de evadir. Gracias por ser mi sostén y mi hogar en tantas ocasiones. ¡Gracias!.

Esta tesis está dedicada especialmente a mi hija, a mis padres y  
a mi abuela Amelia.

**ÍNDICE**

<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO I: EL CÁNCER DE PRÓSTATA.....</b>	<b>5</b>
1.1 La próstata: aspectos generales.....	6
1.2 Patologías asociadas a la próstata.....	8
1.3 Aspectos generales del cáncer.....	9
1.4 Incidencia del cáncer en la población.....	12
1.5 Incidencia del PCa en la población.....	13
1.6 Características y etapas del PCa.....	14
1.7 Diagnóstico del PCa.....	17
1.8 Alteraciones genéticas asociadas al PCa.....	18
1.9 Etiología del PCa.....	20
<b>CAPITULO II: TERAPIAS PARA EL CÁNCER DE PRÓSTATA.....</b>	<b>22</b>
2.1 Distintos abordajes para el tratamiento del PCa.....	25
<b>CAPÍTULO III: AGENTES ANTITUMORALES PARA EL CRPC UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.....</b>	<b>31</b>
3.1 El paclitaxel como tratamiento para PCa.....	32
3.2 El ciclo celular como blanco terapéutico para el cáncer de próstata: flavopiridol.....	34
3.3 El estrés oxidativo y la inhibición de la angiogénesis como blanco terapéutico para el PCa: análogos de talidomida.....	37
3.4 Inhibición de PARP en células deficientes en BRCA1 como posible terapia para el PCa: olaparib.....	42
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>



---

CAPITULO I: LÍNEAS CELULARES, DROGAS, TRATAMIENTOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS. ....	49
1.1 Cultivo de células .....	51
1.2 Obtención y diluciones de drogas.....	52
1.3 Obtención de plásmidos .....	52
CAPITULO II: MÉTODOS PARA ANALIZAR EXPRESIÓN DE GENES, PROTEÍNAS Y ENSAYOS CELULARES .....	54
2.1 Análisis de expresión génica a nivel de ARN mensajero .....	55
2.2 Determinación de la viabilidad celular: MTS.....	60
2.3 Ensayo clonogénico de formación de focos .....	61
2.4 Ensayo migración celular por herida o “wound healing assay” .....	62
2.5 Determinación del contenido de ADN por citometría de flujo. ....	63
2.6 Determinación de apoptosis por citometría de flujo .....	63
CAPITULO III: ESTUDIOS IN VIVO.....	65
3.1 Experimentos con xenotransplantes.....	66
3.2 Generación de xenotransplantes.....	66
3.3 Análisis de la expresión génica a nivel de ARN mensajero.....	68
3.4 Análisis histológico. ....	66
3.5 Análisis estadístico. ....	66
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
CAPÍTULO I: ESTUDIOS IN VITRO CON ANÁLOGOS DE TALIDOMIDA .....	70
1.1. Los análogos de talidomida en altas concentraciones disminuyen la viabilidad de líneas de PCa. ....	71
1.2. Los análogos de talidomida GU990 y GU998 disminuyen la capacidad clonogénica de la línea celular PC3 .....	73
1.3. La línea no tumoral HEK293 es resistente a altas concentraciones de CPS49.....	73

---

CAPITULO II: ESTUDIOS IN VITRO DE LA COMBINACIÓN DEL ANÁLOGO DE TALIDOMIDA CPS49 CON FLAVOPIRIDOL O PACLITAXEL .....	76
2.1. Dosis bajas de flavopiridol o paclitaxel son citotóxicas para las líneas celulares de PCa. ....	77
2.2. La combinación de CPS49 con flavopiridol o paclitaxel disminuyen la viabilidad celular de las líneas celulares de PCa.....	78
2.3. La combinación del CPS49 con flavopiridol o paclitaxel inhiben la formación de colonias en la línea PC3 .....	81
2.4. El tratamiento con flavopiridol disminuye la capacidad migratoria de las células PC3 .....	82
2.5. La combinación de flavopiridol y CPS49 induce arresto en el ciclo celular .....	84
2.6. La combinación de flavopiridol y CPS49 induce apoptosis en la línea celular PC3.....	85
2.7. El tratamiento de células PC3 con flavopiridol o su combinación con CPS49 reduce la expresión de genes involucrados en distintos procesos celulares .....	86
CAPITULO III: EFECTO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS SOBRE CÉLULAS TUMORALES CON DISTINTOS NIVELES DE BRCA1. ....	89
3.1. La baja expresión de BRCA1 aumenta la sensibilidad a la combinación de flavopiridol y CPS49 en el PCa.....	91
3.2. Las líneas celulares de PCa con baja expresión de BRCA1 son más sensibles al tratamiento con olaparib .....	92
3.3. El olparib aumenta la sensibilidad del flavopiridol y el CPS49 en las células PC3 .....	93
CAPÍTULO 4: ESTUDIOS IN VIVO UTILIZANDO CPS49, FLAVOPIRIDOL Y PACLITAXEL PARA LA TERAPIA DEL PCA .....	96
4.1. El tratamiento con flavopiridol o CPS49 reduce el crecimiento tumoral en xenotransplantes originados a partir de células PC3.....	98
4.2 La combinación de flavopiridol y CPS49 disminuyó el crecimiento tumoral en xenotransplantes originados a partir de células PC3.....	100

4.3. Análisis histológicos de los tumores extraídos de ratones nude expuestos a distintos tratamientos.....	102
4.4. El tratamiento combinado de flavopiridol y CPS49 in vivo reprime genes involucrados en migración, adhesión e invasión .....	104
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>106</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>108</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>113</b>

## PUBLICACIONES

Los contenidos presentes en este trabajo de Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones.

**Florencia Zalazar**, Paola De Luca, Kevin Gardner, William D. Figg, Roberto Meiss, Raúl Germán Spallanzani, Pablo Vallecorsa, Belén Elguero, Javier Cotignola, Elba Vazquez, Adriana De Siervi. *“Low doses of CPS49 and flavopiridol combination as potential treatment for advanced prostate cancer”*. Current Pharmaceutical Biotechnology. Aceptado.

Además he participado en trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones de gran relevancia para este trabajo de tesis.

1. De Luca P, Moiola C, **Zalazar F**, Gardner K, Vazquez ES, De Siervi A. *“BRCA1 and p53 regulate critical prostate cancer pathways”*. Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 2013 Sep;16(3):233-8.
2. De Luca P, Vazquez ES, Moiola CP, **Zalazar F**, Cotignola J, Gueron G, Gardner K, De Siervi A. *“BRCA1 loss induces GADD153-mediated doxorubicin resistance in prostate cancer.”* Mol Cancer Res. 9(8):1078-90 (2011).
3. Moiola CP, De Luca P, **Zalazar F**, Cotignola J, Rodríguez-Seguí SA, Gardner K, Meiss R, Vallecorsa P, Pignataro O, Mazza O, Vazquez ES, De Siervi A. *“Prostate tumor growth is impaired by CtBP1 depletion in high-fat diet-fed mice”*. Clin Cancer Res. 2014 Aug 1;20(15):4086-95.

**ABREVIATURAS**

ADN = Ácido desoxirribonucleico

ADNc = ADN copia

AR = Receptor de andrógenos

ARN = Ácido ribonucleico

ARNm = Ácido ribonucleico mensajero

Bcl-2 = B-cell CLL/lymphoma 2

BPH = Hiperplasia prostática benigna

BRCA1 = Gen de la susceptibilidad al cáncer de mama 1 (Breast Cancer susceptibility gene 1)

BRCA2 = Gen de la susceptibilidad al cáncer de mama 2 (Breast Cancer susceptibility gene 2)

CRPC = Cáncer de próstata resistente a la castración

DHT = Dihidrotestosterona

DMSO = Dimetilsulfóxido.

dNTPs = Desoxinucleótido tri-fosfato

DRE = Examen digital rectal

DSBs: daño en las dos hebras de ADN

E. coli = *Escherichia coli*

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

EDTA TE = Solución Tris-EDTA

EMT = Transición epitelio-mesenquimal.

FDA= Food and drug administration

GST= Glutación-S-Transferasa

H&E = Hematoxilina y eosina

HIF= factor inducible por hipoxia

HR= recombinación homóloga

i.p. = intra-peritoneal

MAD2L1 = Mitotic arrest deficient-like 1 (Mad2)

MDR1= gen de multiresistencia

MTS= 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolio

NCI = Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (National Cancer Institute)

NHEJ= Non-homologous end joining

NIH = National Institutes of Health

p.i.= post inyección

PARP = Poli-ADP ribosa polimerasa

PBMCs= Peripheral blood mononuclear cell

PBS = Buffer salino fosfato

PCa = Cáncer de Próstata

PIA = Atrofia inflamatoria proliferativa

PIN = Neoplasia intraepitelial prostática

PMS = Fenazina metosulfato

PMSF = Fenil metil sulfonil fluoruro

PSA = Antígeno prostático específico

qPCR = Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, en tiempo real.

Rb = Retinoblastoma

ROS = especies reactivas de oxígeno

RT = Retrotranscripción, transcripción reversa

RT-qPCR = Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, en tiempo real.

s.c. = sub-cutáneo

SFB = Suero fetal bovino

SSBs = daño simple cadena del ADN

TAE = Solución de Tris, Acético

TEMED = Tetrametilenetilendiamina

TNF- $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF = factor de crecimiento vascular endotelial

# **INTRODUCCIÓN**

## **CAPÍTULO I**

# **EL CÁNCER DE PRÓSTATA**



### 1.1 La próstata: aspectos generales

La próstata es una glándula sexual accesoria, perteneciente al aparato genitourinario masculino, que está ubicada en la base de la vejiga urinaria por delante del recto y rodea a la uretra.

La glándula está involucrada en la producción de parte del líquido seminal, cuyos componentes brindan nutrientes y protección a los espermatozoides contenidos en el semen eyaculado. Su crecimiento y la formación de las secreciones prostáticas están controlados por hormonas esteroideas y factores de crecimiento, producidos local y sistémicamente (Sampson et al., 2007).

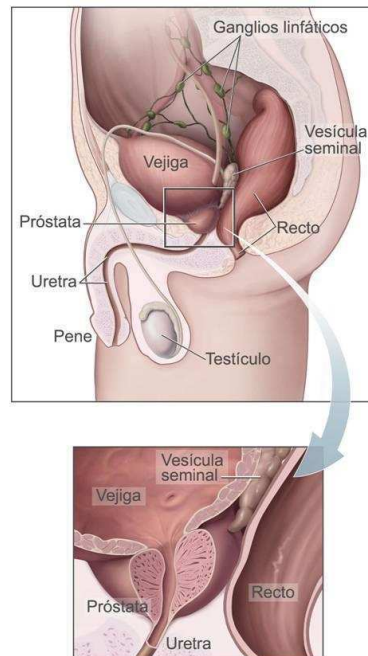
Las secreciones prostáticas son levemente alcalinas, están compuestas principalmente por azúcares y su contenido proteico es menor al 1%. Entre ellas se encuentran las enzimas proteolíticas, la fosfatasa ácida y el antígeno prostático específico (PSA). Este último es sintetizado en la próstata y su producción depende tanto de la presencia de andrógenos como del tamaño de la glándula. La función del PSA es escindir las proteínas seminogelina I y II permitiendo la licuefacción del semen que comienza a coagularse tras la eyaculación (Balk et al., 2003). En los hombres sanos, una parte pequeña del PSA pasa a la circulación sanguínea, por lo que un aumento de su concentración en la sangre se utiliza como indicador de un crecimiento anormal o inflamación de la glándula prostática. Es por ello que se la utiliza como el marcador más importante para la detección de cáncer de próstata (PCa).

El desarrollo y las funciones de la próstata son completamente dependientes de los andrógenos. El metabolito responsable de estas acciones es la dihidrotestosterona (DHT), un producto de la reducción de testosterona por la acción de la enzima 5- $\alpha$  reductasa en las células de la próstata (Debes and Tindall, 2002).

En el epitelio prostático se pueden distinguir tres tipos celulares predominantes: las células secretorias luminales, las células basales epiteliales y las células neuroendócrinas. Las células luminales producen proteínas secretorias que forman parte del fluido seminal como el PSA y son dependientes de andrógenos (Liu et al., 1997).

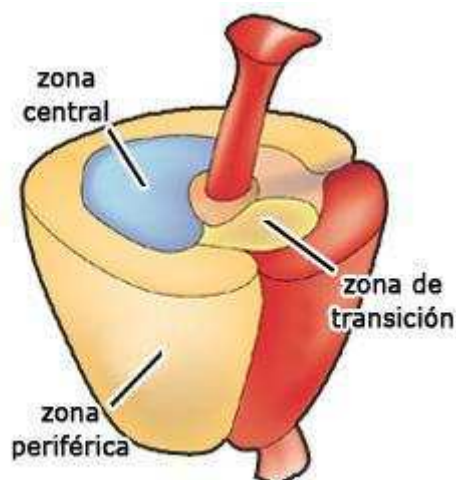
Las células basales epiteliales forman una capa continua que expresan factores que protegen del daño al ADN, tales como la proteína de defensa antioxidante Glutación-S-Transferasa (GST) y el gen anti-apoptótico Bcl-2 (Bui and Reiter, 1998) y constituyen el

reservorio de progenitores de células luminales (Wang et al., 2001). El tercer tipo celular es el neuroendócrino, es independiente de andrógenos y en el PCa agresivo se produce una hiperproliferación de esta capa de células (Abrahamsson et al., 1998).



**Figura 1. Esquema anatómico de la ubicación de la próstata en el cuerpo humano magnificación de la región prostática ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).**

Una próstata sana tiene aproximadamente 3 cm de longitud. Consta de una porción glandular que comprende dos tercios de la misma y un tercio de otra porción fibromuscular. Según su morfología y función se distinguen las siguientes zonas (Figura 2):



**Figura 2. Esquema de la localización de las zonas glandulares prostáticas.**

**Zona anterior:** se ubica delante de la uretra, es fibromuscular y no presenta elementos glandulares.

**Zona central:** Se ubica detrás de la uretra y es atravesada por los conductos eyaculadores. Es una zona glandular.

**Zona periférica:** es la subdivisión anatómica más grande de la próstata glandular.

**Zona transicional:** es un pequeño grupo de conductos que están relacionados con la uretra proximal.

### 1.2 Patologías asociadas a la próstata

Las patologías que se asocian a la próstata traen como consecuencia problemas o dificultades al momento de orinar, como por ejemplo una alta frecuencia de orinado, sorpresiva y urgente necesidad de orinar o dolor durante la eyaculación, entre otros síntomas descritos ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)). Entre las patologías descritas las más frecuentes son:

**Prostatitis:** inflamación de la próstata que ocurre entre un 10 % y un 15 % de los hombres. Un 27% de los pacientes que deben someterse a biopsias prostáticas debido a un alto nivel de PSA muestran evidencias de prostatitis (Harik and O'Toole, 2012).

**Hiperplasia benigna prostática (BPH):** se describe como el crecimiento no maligno en el tamaño de la próstata. Se cree que su etiología es multifactorial involucrando tanto factores ambientales como genéticos. También, puede producirse por un aumento relativo de los estrógenos sobre la testosterona que aparece en los hombres mayores de 60 años. Es por ello que la incidencia del BPH se incrementa con la edad y se estima que el 70 % de los hombres de 70 años han desarrollado esta patología. Aunque generalmente es asintomática, algunos pacientes pueden sufrir síntomas obstructivos del tracto urinario.

**Cáncer de próstata (PCa):** es uno de los tipos de cáncer más comunes en los hombres. Se estima que entre el 15% y el 30% de los hombres mayores de 50 años, y el 80% de los hombres mayores de 80 años, presentan PCa no diagnosticado y microscópico (Taichman et al., 2007). Desarrollaremos esta patología más adelante en esta sección.

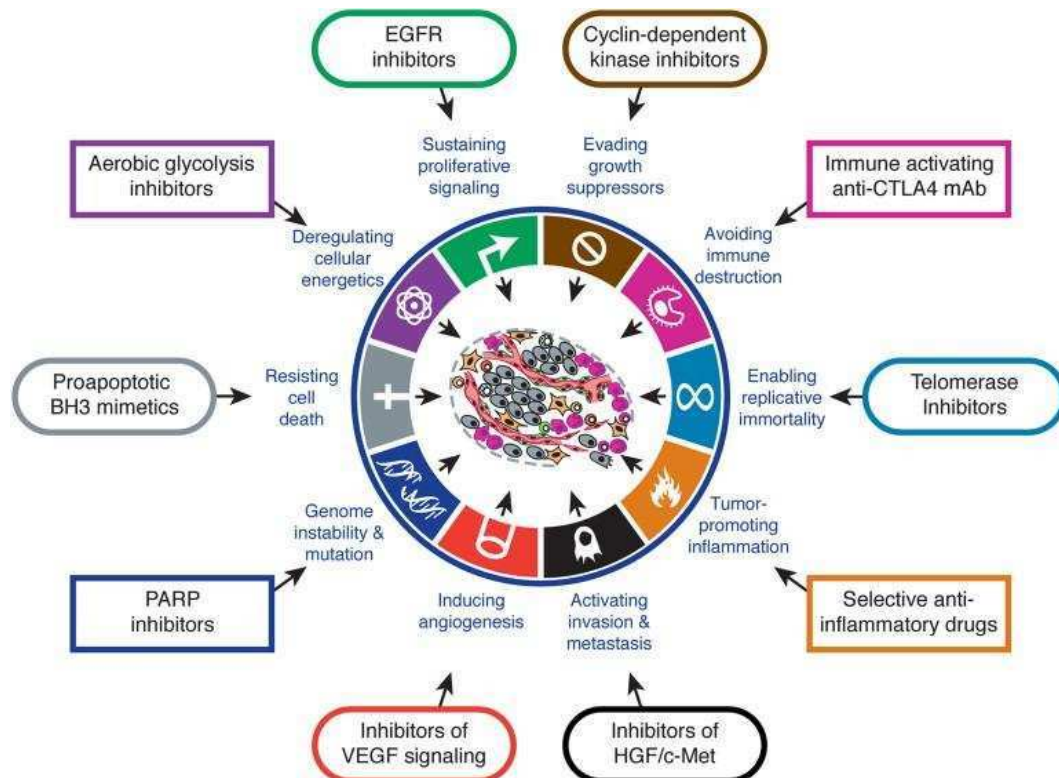
### 1.3. Aspectos generales del cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se refiere al crecimiento anormal de las células de un organismo que se dividen de manera descontrolada y son capaces de invadir tejidos distantes del lugar de origen. El proceso de tumorigénesis, que provoca la transformación de una célula normal a una célula maligna, se desarrolla en varias etapas a través de defectos en los circuitos regulatorios de las células afectando y alterando su proliferación y homeostasis. En las últimas décadas se ha trabajado incesantemente para comprender los mecanismos que llevan a la tumorigénesis, y a partir de estas investigaciones se han podido determinar características claves que comparten todos los tipos de cánceres (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dentro de estas características se encuentran (Figura 3):

- **Mantenimiento de señales de crecimiento:** las células tumorales pueden adquirir la capacidad de mantener las señales de proliferación activas mediante distintos procesos: estimulación proliferativa autócrina o parácrina, hipersensibilidad a dichas señales por aumento de receptores, o generando una independencia a los factores de crecimiento al activar complejos de señalización río abajo del receptor.
- **Insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento:** las células tumorales son capaces de evadir las señales anti-proliferativas, evitando entrar en procesos de quiescencia y de arresto de ciclo celular, al anular por ejemplo, las señales desencadenadas por algunos supresores tumorales.
- **Resistencia a muerte celular programada:** esta característica es adquirida en la células tumorales a través de la activación de proteínas que desencadenan señales anti-apoptóticas, como por ejemplo los miembros de la familia Bcl-2, y/o al bloqueo de los efectos de genes supresores tumorales que son efectores de señalización para apoptosis, como p53.
- **Potencial replicativo ilimitado:** las células tumorales son inmortales ya que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sorteando los mecanismos que las conducen a senescencia y muerte celular. Estas células al re-expresar la enzima telomerasa, evitan desencadenar los procesos antes mencionados, al proteger y mantener un tamaño adecuado en el largo de los telómeros de los cromosomas.

- **Inducción de angiogénesis:** las células tumorales son capaces de inducir angiogénesis al secretar factores que estimulan la formación de nuevos vasos, como por ejemplo el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y de esta manera asegurarse el transporte de oxígeno y nutrientes a todas las regiones del tumor en crecimiento.



**Figura 3. Esquema que muestra las características claves de las células tumorales y de los blancos terapéuticos en el cáncer.** En la figura se describen las capacidades adquiridas por las células tumorales necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral. También se indican los compuestos que interfieren con las características tumorales presentadas (Extraído de (Hanahan and Weinberg, 2011)).

- **Activación de procesos de invasión y metástasis:** por pérdida de expresión de moléculas de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular, las células tumorales son capaces de ingresar en un proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal (EMT) y de esta manera escapar del lugar donde se originaron y migrar a otros sitios

donde posteriormente adoptaran nuevamente el fenotipo epitelial y desarrollarán una metástasis.

Las características descritas permiten a las células tumorales sobrevivir, proliferar y diseminarse. Los mecanismos que conducen a las células a adaptar estas capacidades son variables y dependen principalmente de dos factores claves; su **inestabilidad genómica**, que genera mutaciones al azar y re-arreglos cromosómicos en las células tumorales, así como también un **estado inflamatorio crónico** que favorezca la progresión del tumor (Figura 3). Es necesario para que el tumor pueda desarrollarse y mantenerse que las células **reprogramen su actividad metabólica energética** de manera de afrontar un continuo crecimiento y proliferación al igual que deben ser capaces de **evadir los ataques de células del sistema inmune no asociadas al tumor** (Figura 3).

A raíz del avance en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis del cáncer, comenzaron a desarrollarse nuevas terapias antitumorales orientadas a inhibir dichos mecanismos (Figura 3). La especificidad de acción de las drogas sobre una de las características de las células tumorales es considerada como virtud en tanto inhibe un mecanismo particular e importante para el desarrollo del tumor y preserva de efectos no deseados sobre otros blancos, generando menor toxicidad. Por el otro lado, se sabe que distintas vías de señalización regulan una misma capacidad celular. Por lo cual, la inhibición mediante un agente antitumoral de una de las vías de señalización, no bloqueará por completo el mecanismo celular al que fue orientado la terapia, permitiendo que algunas células tumorales sobrevivan, se adapten a la presión selectiva generada por la terapia y aumente el crecimiento tumoral generando una recaída a nivel clínico.

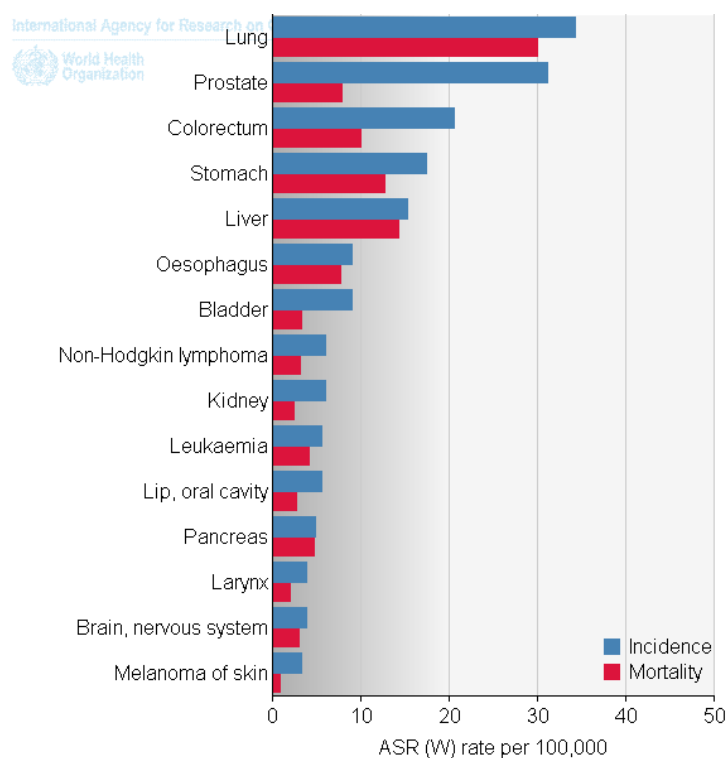
Así también se conoce otro mecanismo de adquisición de resistencia a la terapia en el que las células tumorales adquieren la capacidad de reducir la dependencia a cierta característica hacia la que fue orientada la terapia, para aumentar la dependencia a otra cuyas vías de señalización no fueron afectadas por el tratamiento aplicado.

Estas consideraciones sugieren que el desarrollo de nuevas drogas y el diseño de nuevos protocolos dirigidos hacia múltiples blancos moleculares, vías de señalización y características particulares de las células tumorales resultarán en terapias antitumorales nuevas, más efectivas y duraderas.

*En este trabajo de tesis estudiaremos el efecto antitumoral de drogas que inhiben características específicas de la célula tumoral, así como también nuevas combinaciones de dichas drogas con el objetivo de orientar la terapia hacia distintos blancos celulares, en un tipo de cáncer particular.*

#### **1.4. Incidencia del cáncer en la población**

El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa de muerte en países en desarrollo (Jemal et al., 2011). El proyecto GLOBOCAN 2012 tiene como objetivo estimar las tasas de incidencia, mortalidad y prevalencia de todos los tipos de cáncer a nivel mundial, discriminando las mismas, por sexo y edad. A partir de este proyecto se determinó que el cáncer de pulmón es el más frecuente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo (Figura 4).



**Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad de diversos tipos de cáncer en hombres a nivel mundial. Datos aportados por el proyecto GLOBOCAN 2012 ([www.globocan.iarc.fr/](http://www.globocan.iarc.fr/)).**

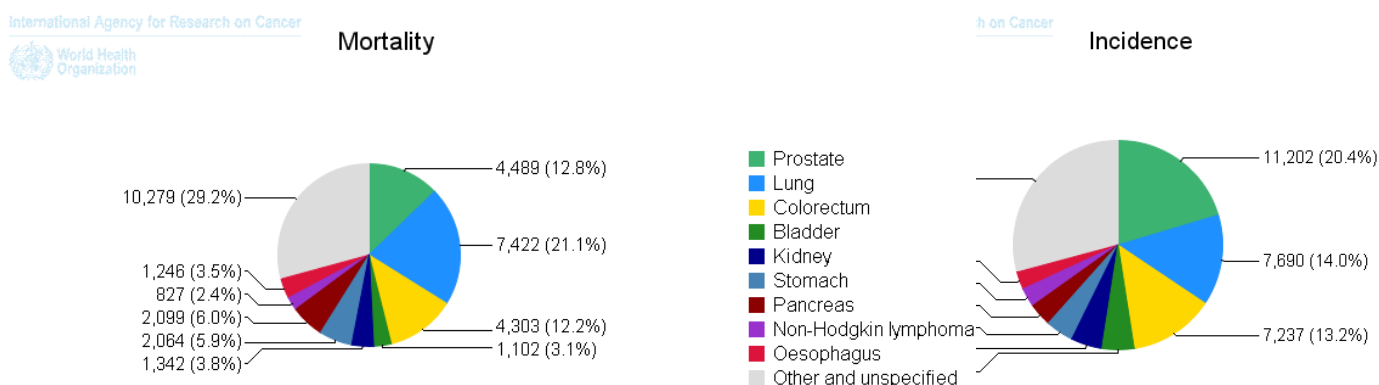
Según la incidencia de cáncer, nuestro país se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media alta.

Los tumores malignos constituyen la principal causa de muerte entre personas de 40 a 64 años y la segunda en personas mayores de 64 años. Siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte por cáncer en hombres y el de mama en mujeres (Jemal et al., 2011).

### 1.5. Incidencia del PCa en la población

El PCa es el segundo tipo de cáncer más frecuente y la sexta causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo, representando el 14% del total de los casos y el 6% del total de muertes por cáncer en 2008 (Jemal et al., 2011). Las tasas de incidencia de PCa más elevadas se encuentran en los países de Nueva Zelanda, América del norte y Europa occidental (Jemal et al., 2011).

En Argentina el PCa es el cáncer de mayor incidencia y el segundo en mortalidad luego del cáncer de pulmón (Figura 5) (<http://www.msal.gov.ar/inc>).



**Figura 5. Tasas de mortalidad e incidencia de diferentes tipos de cáncer en el hombre en la población argentina. El PCa es el de mayor incidencia y el segundo en mortalidad en la Argentina. Datos extraídos del proyecto GLOBOCAN 2008 y del Instituto Nacional de Cáncer de la Argentina.**



### 1.6. Características y etapas del PCa

El PCa es una enfermedad que se presenta generalmente de forma latente e indolora sin ocasionar síntomas clínicos en pacientes de edad avanzada. Sin embargo el cáncer puede tornarse agresivo, diseminándose a los tejidos cercanos como vejiga, vesícula seminal y recto o metastatizar a los nódulos linfáticos, hueso, pulmón u otros órganos (Schulz et al., 2003).

Esta enfermedad es considerada por algunos autores como una patología normal asociada a la edad de los hombres. Se estima que entre el 15% y el 30% de los hombres mayores de 50 años, y el 80% de los hombres mayores de 80 años, presentan PCa no diagnosticado y microscópico. Así por ejemplo, en un estudio realizado en autopsias de hombres fallecidos por causas diferentes a PCa, se encontró que el 70% presentaban esta enfermedad en forma localizada (Scardino et al., 1992).

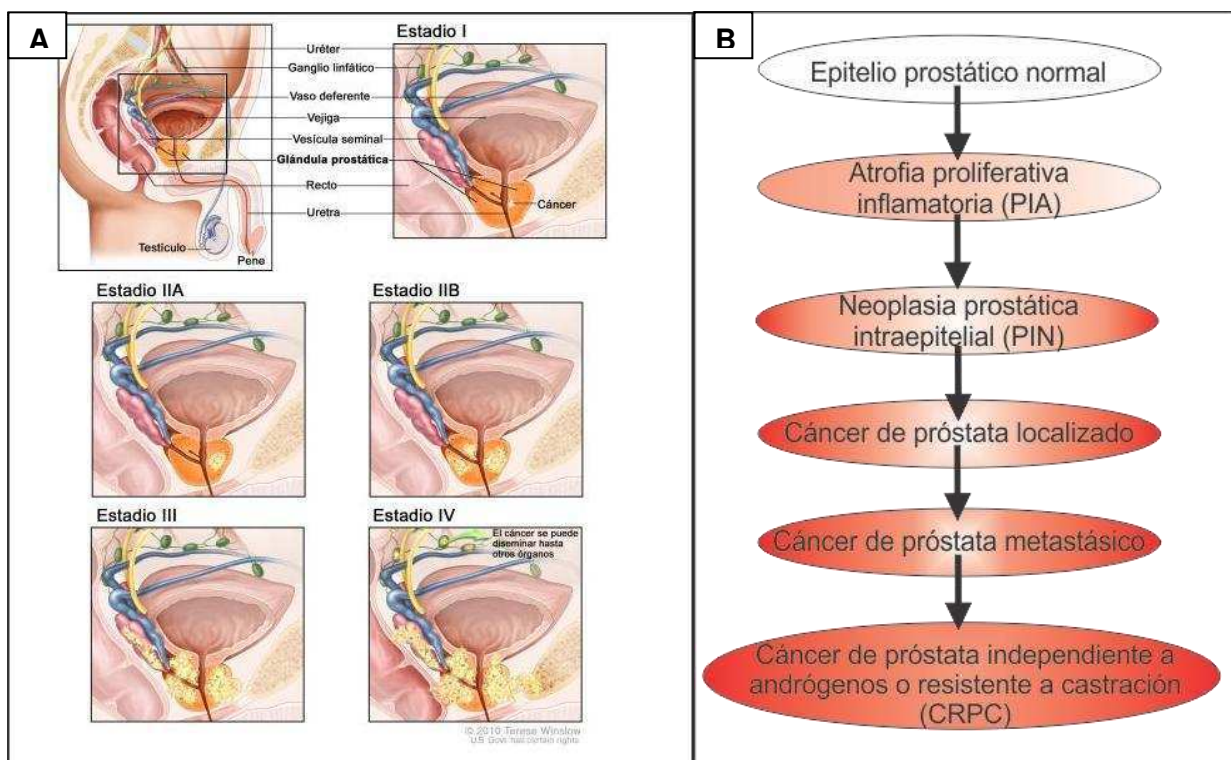
La tumorigénesis prostática temprana está asociada a una displasia benigna que comienza con una atrofia inflamatoria proliferativa (PIA) y progresa a una neoplasia prostática intraepitelial (PIN), la cual en algunos casos, evoluciona en un carcinoma (Sampson et al., 2007).

En la zona periférica de la próstata como resultado de una inflamación crónica o aguda debida a factores desconocidos (patógenos, enfermedades autoinmunes, dieta, etc.), las células epiteliales aumentan su proliferación adquiriendo un fenotipo intermedio entre las células basales y las luminales. Este proceso es denominado **atrofia proliferativa inflamatoria (PIA)** (De Marzo et al., 2007). Dichas células epiteliales están sujetas a procesos moleculares de stress, lo cual en algunas células puede desencadenar inestabilidad genética y promover la transición hacia un estadio de mayor progresión de la enfermedad (Nelson et al., 2003).

En las zonas adyacentes a las lesiones de PIA se observan zonas con otro tipo de lesión pre-neoplásica denominada **neoplasia intraepitelial prostática (PIN)**. Estas lesiones son las consideradas precursoras del establecimiento y desarrollo del tumor en el tejido prostático. El PIN se caracteriza por una proliferación celular de las células epiteliales del ducto prostático principalmente en la zona periférica de la glándula observándose una marcada heterogeneidad genética y pérdida de diferenciación celular. Histológicamente pueden distinguirse dos etapas de esta lesión, PIN de bajo o de alto grado fuertemente asociadas con el desarrollo del carcinoma. Al igual que el PCa, estas

lesiones son multifocales y su incidencia se incrementa con la edad. La aparición de PIN de alto grado, suele preceder a la del carcinoma al menos en 10 años, ya que éste es el período necesario para que ocurra la progresión tumoral (Abate-Shen and Shen, 2000) (Figura 6A).

La primera evidencia histológica de cáncer es una progresiva pérdida de la membrana basal en la glándula, seguido de anomalías en los marcadores de diferenciación, incremento en el tamaño del núcleo de las células y variación del contenido genómico ocasionando inestabilidad genómica, y un aumento en la proliferación celular.



**Figura 6. Esquema representativo de las etapas de desarrollo del PCa. A)** Ilustración de la localización de tumor de próstata y su propagación a lo largo de las diferentes etapas a las diferentes regiones del organismo (Extraído de Instituto Nacional del Cáncer, Institutos Nacionales de la Salud, EE.UU) **B)** Diagrama de flujo representando el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas hasta el establecimiento del PCa y sus etapas posteriores (Adaptado de (Nelson et al, 2003)).

En el primer estadio (**Estadio I**), las células tumorigénicas se asemejan a las normales y la glándula se mantiene dentro de los límites de tamaño normal al tacto. El tumor se encuentra localizado en la cápsula de la próstata, sin compromiso ganglionar, es asintomático, pero en caso de ser detectado, generalmente se adopta una postura de

seguimiento cuidadoso o “Active Surveillance” evaluando los niveles séricos de PSA y tacto prostático por examen digital del recto (DRE). Dependiendo de los resultados de estos exámenes, en ocasiones se solicita una biopsia prostática para precisar el diagnóstico.

El tumor en **estadio II** aún se encuentra confinado a la glándula prostática, pero ya es detectado mediante DRE, mientras que en el **estadio III**, se observa diseminación de las células tumorales hasta las vesículas seminales. A estos últimos 2 estadios también se los conoce como **PCa localmente avanzado** y se caracterizan por que las células tumorales son dependientes de andrógenos para crecer y sobrevivir. En el **estadio IV**, también conocido como **metastásico**, las células tumorales metastatizan principalmente a hueso, ocasionando lesiones osteolíticas, que causan dolor y reducen la movilidad de los pacientes (Figura 6). El tratamiento aplicado en estas etapas es la terapia hormonal. Durante los primeros años de tratamiento, los pacientes responden satisfactoriamente, pero al cabo de un tiempo las células tumorales se vuelven resistentes a la ablación de andrógenos y progresan de manera descontrolada nuevamente.

Es en este momento que se reconoce un estadio final de la enfermedad, denominado **cáncer independiente a andrógenos o resistente a castración (Castration Resistant Prostate Cancer – CRPC)**, en donde la terapia de ablación de andrógenos ya no es más efectiva. Durante este estadio la terapia se focaliza solo en mejorar la sobrevida y calidad de vida del paciente ya que aún no se han identificado o generado tratamiento para este estadio de la enfermedad ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

El tumor en **estadio II** aún se encuentra confinado a la glándula prostática, pero ya es detectado mediante DRE, mientras que en el **estadio III**, se observa diseminación de las células tumorales hasta las vesículas seminales. A estos últimos 2 estadios también se los conoce como **PCa localmente avanzado** y se caracterizan por que las células tumorales son dependientes de andrógenos para crecer y sobrevivir. En el **estadio IV**, también conocido como **metastásico**, las células tumorales metastatizan principalmente a hueso, ocasionando lesiones osteolíticas, que causan dolor y reducen la movilidad de los pacientes (Figura 6). El tratamiento aplicado en estas etapas es la terapia hormonal. Durante los primeros años de tratamiento, los pacientes responden satisfactoriamente, pero al cabo de un tiempo las células tumorales se vuelven resistentes a la ablación de andrógenos y progresan de manera descontrolada nuevamente. Es en este momento que se reconoce un estadio final de la enfermedad, denominado **cáncer independiente**

**a andrógenos o resistente a castración (Castration Resistant Prostate Cancer – CRPC)**, en donde la terapia de ablación de andrógenos ya no es más efectiva. Durante este estadio la terapia se focaliza solo en mejorar la supervivencia y calidad de vida del paciente ya que aún no se han identificado o generado tratamiento para este estadio de la enfermedad ( [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

Los carcinomas de próstata se clasifican en distinto grado según sus características histológicas, lo que se denomina grado de *Gleason*. De acuerdo a este sistema, al patrón histológico más representativo del tumor se le asigna un grado de 1 a 5, a la segunda morfología histológica más prominente se le asigna otro grado, ambos grados son sumados y reportados como el grado de *Gleason* del tumor. El grado de *Gleason* 3 es el más frecuente en el PCa y consiste en glándulas pequeñas no fusionadas. Un grado de *Gleason* 4 consiste en glándulas pequeñas fusionadas y un grado de *Gleason* 5 consiste en láminas de células anaplásicas sin glándulas distinguibles. Generalmente, los tumores de PCa con un grado de *Gleason* de 5 a 7 son considerados de grado intermedio o moderadamente diferenciados y aquellos con un grado de 8 a 10 son considerados de alto grado o pobremente diferenciados (Gleason, 1966).

### 1.7. Diagnóstico del PCa

Generalmente el PCa se diagnostica por la medición repetida en un período de tiempo de un nivel elevado del PSA y por un examen rectal digital anormal (DRE) (American Cancer Society, 2007). Estos dos métodos también forman parte del control que esta Sociedad recomienda a todos los hombres mayores a 50 años, presenten o no sintomatología. Los niveles de PSA en suero de hombres sanos son bajos, mientras que en hombres con PCa u otros desórdenes prostáticos como infecciones, inflamación o hiperplasia benigna prostática (BPH), son elevados. El valor crítico de PSA en suero es de 4 ng/ml, valores menores a este son considerados normales. Los pacientes que presentan la repetición en el tiempo de valores que excedan el valor crítico son considerados para realizar una biopsia prostática. Gracias al seguimiento de los niveles de PSA en suero, junto con el DRE y la biopsia de la próstata la mayoría de los PCa son descubiertos en la primera fase de la enfermedad, es decir mientras los tumores están localizados en la glándula (Taichman et al., 2007).

Desafortunadamente la medición de PSA no es lo suficientemente sensible ni específico para la detección del PCa clínicamente relevante, ya que los niveles elevados de PSA también pueden variar a causa de otras patologías prostáticas benignas, como infección, inflamación y la BPH. Este hecho ha provocado que en la actualidad el PCa sea sobre-diagnosticado; se estima que hoy en día se brinda tratamiento a 20 pacientes, de los cuales solo uno moriría por PCa (Taichman et al., 2007).

### **1.8. Alteraciones genéticas asociadas al PCa**

El cáncer puede ser originado a partir de alteraciones múltiples en tres clases de genes: los oncogenes, los supresores tumorales y los involucrados en la reparación del ADN. Estos cambios pueden ser genéticos o epigenéticos, causados por carcinógenos químicos, físicos o biológicos, entre otros. Como ocurre con todos los tipos de cáncer, el PCa es una enfermedad genética ocasionada por acumulaciones de mutaciones cromosómicas. En la gran mayoría de los casos, las mutaciones son somáticas, es decir se encuentran únicamente en las células tumorales del epitelio prostático. Cuando algunas mutaciones están presentes en las células germinales se transmiten de generación en generación y están presentes en todas las células del organismo. Esta última modalidad da lugar a los síndromes familiares de PCa, que constituyen entre el 13 y el 26% del total de estos tumores (Hsing and Chokkalingam, 2006). Se han identificado numerosas mutaciones alélicas de baja penetrancia denominadas polimorfismos genéticos, que son relativamente más frecuentes y aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad. En base a todo esto algunos autores atribuyen hasta el 40% de todos los PCa a factores genéticos (Hsing and Chokkalingam, 2006).

Se han desarrollado numerosos estudios con el fin de identificar el o los genes responsables del PCa (Reynolds, 2008) (Shand and Gelmann, 2006). De esta manera, se describieron numerosas vías moleculares desreguladas en la célula tumoral prostática debido a la alteración de la expresión de genes supresores de tumores y oncogenes.

A continuación describiremos brevemente las alteraciones genéticas que están específicamente asociadas al PCa:

- **re-arreglos cromosómicos:** los más frecuentes observados ocurren en los autosomas 8, 13, 7, 10, 16, 6 y 17 en orden decreciente de aparición, y en los cromosomas sexuales X e Y (Reynolds, 2008).

- **inactivación de genes supresores tumorales:** los genes supresores tumorales más importantes identificados en próstata son los siguientes:

**PTEN:** regula las vías de señales involucradas en la proliferación celular y la apoptosis de las células normales, y la pérdida de su función contribuye a la progresión del cáncer (Hughes et al., 2005)

**p53:** desempeña un papel crítico en el control del ciclo celular, modulando el crecimiento y la proliferación celular. Su expresión aberrante ha sido asociada a la progresión de PCa hacia estadios de hormono-independencia y desarrollo de metástasis óseas (Hughes et al., 2005).

**RB:** su inactivación tiene un rol relevante en la transformación neoplásica, induce la actividad del factor de transcripción E2F1 que regula genes involucrados en la proliferación (Hughes et al., 2005).

**NKX3.1:** específico de próstata, esencial en el desarrollo normal de la glándula. La pérdida de su expresión podría ser uno de los eventos más tempranos en suceder y se relaciona con la progresión del PCa (Shand and Gelmann, 2006).

**GST1 (glutación S-transferasa):** enzima que participa en la prevención del daño en el ADN (Hughes et al., 2005).

**BRCA1:** gen de susceptibilidad al cáncer de mama (BRCA1). Mutaciones germinales en este gen aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, ovario (Miki et al., 1994) y están asociadas con una mayor agresividad y mal pronóstico del PCa (Agalliu et al., 2009) (Gallagher et al., 2010). Recientemente fue reportado que mutaciones en BRCA1 aumentan el riesgo de desarrollar PCa (Castro and Eeles, 2012) (Leongamornlert et al., 2012).

- **activación de oncogenes:** se identificaron pocos oncogenes involucrados en la tumorigénesis prostática, entre ellos encontramos a MYC (Hughes et al., 2005); BCL-2 (Hughes et al., 2005); ETS (Clark et al., 2007).

- **alteraciones en el receptor de andrógenos:** Los andrógenos son esenciales para el desarrollo y crecimiento de la próstata, principalmente la testosterona y su metabolito activo la DHT. El AR, receptor nuclear de hormonas esteroideas, se une a la DHT en el citoplasma, dimeriza y transloca al núcleo. De esta manera, el receptor activo

interacciona con las secuencias ubicadas en los sitios ARE (elementos respondedores a andrógenos) de los promotores promoviendo la transcripción de los genes blancos. Existen variantes alélicas este gen en la población general, lo que indica que es altamente polimórfico. Fueron relacionados al PCa el polimorfismo CAG (Shand and Gelmann, 2006); mutaciones en la secuencia del receptor, que aumentan su actividad o generan la pérdida de especificidad del mismo (Schulz et al., 2003).

### 1.9. Etiología del PCa

El PCa es una enfermedad multifactorial en la que tanto factores genéticos como ambientales influyen el riesgo de desarrollar esta patología. Algunos autores clasifican a estos factores de riesgo como **endógenos o constitucionales** (edad, historia familiar, perfil hormonal, raza) y **factores exógenos**, que corresponden con el estilo de vida del paciente (dieta, ocupación y exposición a diferentes agentes ambientales carcinogénicos) (Bostwick et al., 2004).

Recientemente, numerosos estudios epidemiológicos demostraron que tanto el estilo de vida como la dieta tienen un rol crucial en la biología y la tumorigénesis del PCa, influenciando no solo el desarrollo sino también la progresión de la enfermedad (Cheetham and Katz, 2011).

#### 1.9.1 Rol de BRCA1 en la etiología del PCa

Dentro de los factores constitucionales o endógenos podemos encontrar los factores genéticos, familiares y hereditarios, que son de particular relevancia en este trabajo debido a la importancia de la expresión de BRCA1 en los modelos analizados.

El gen de la susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1, codifica para una proteína reconocida como supresora tumoral (Miki et al, 1994). Entre sus funciones podemos describir la participación en la respuesta al daño en el ADN, en la regulación del ciclo celular, en la regulación de la apoptosis, en la co-regulación de la transcripción (Yoshida and Miki, 2004) y en la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos.

Varias líneas de evidencias implicaron al gen BRCA1 en la patogénesis de PCa. Como por ejemplo: a) existe una gran incidencia de PCa entre parientes masculinos de

pacientes con cáncer de mama (Tulinius et al., 1992); b) los portadores de BRCA1 mutado tienen un alto riesgo de desarrollar PCa, además de cáncer de mama y ovario (Castro and Eeles, 2012; Douglas et al., 2007; Ford et al., 1994) (Leongamornlert et al., 2012); y c) BRCA1 interactúa directamente con el AR estimulando su actividad (Park et al., 2000; Yeh et al., 2000).



## **CAPITULO II**

# **TERAPIAS PARA EL CÁNCER DE PRÓSTATA**

A pesar de los avances en el entendimiento del crecimiento y desarrollo del PCa, sigue siendo el cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de muerte debido a cáncer en hombres en nuestro país y en el mundo (Jemal et al., 2011).

La mayoría de los pacientes a los que se les diagnostica la enfermedad en estadios tempranos, en los que el tumor todavía responde a andrógenos, son beneficiados con la terapia de ablación de andrógenos durante un tiempo determinado. Dicha terapia es efectiva mientras las células tumorales respondan a los andrógenos para crecer. La activación del AR por andrógenos (como testosterona o DHT) estimula la proliferación celular e inhibe la apoptosis en las células tumorales, permitiendo el crecimiento y la progresión del tumor (Feldman and Feldman, 2001). Cuando el AR es activado por andrógenos, transloca al núcleo y se une a elementos de respuesta a andrógenos en el ADN e induce la activación transcripcional de genes blancos (Shand and Gelmann, 2006).

Eventualmente la enfermedad progresará a un nuevo estadio molecular y clínicamente heterogéneo, conocido como CRPC, caracterizado con un pronóstico complicado y como un desafío terapéutico (Pienta and Bradley, 2006). En la progresión del cáncer al estadio resistente a hormonas, inducido por la supresión continua de andrógenos, la señalización del AR es mantenida mediante una variedad de mecanismos: aumento de la expresión del AR (Chen et al., 2004), amplificación del gen de AR (Koivisto et al., 1997), mutaciones genéticas en el gen de AR que producen cambios estructurales (Taplin et al., 1995) o variantes de splicing en el ARNm (Sun et al., 2010). Estos mecanismos disminuyen la especificidad y llevan a una inapropiada activación del receptor por moléculas distintas a los andrógenos (estrógenos, progestinas, tirosina quinasas), resultado en un AR fenotípicamente promiscuo. También se ha descrito que en CRPC existe una continua producción de andrógenos por la glándula adrenal y por el cáncer mismo (Mostaghel et al., 2007), que generan un nivel de testosterona intraprostático suficiente para estimular el AR.

Las opciones terapéuticas para este estadio refractario a hormonas, incluye tratamiento de los síntomas, radioterapia en los sitios más dolorosos, bifosfonatos y quimioterapia paliativa (Leo et al., 2011). La primera línea de quimioterapia actual, basada en docetaxel, reduce los niveles de PSA, alivia el dolor y mejora la sobrevida de los pacientes (Petrylak et al., 2004).

Eventualmente, el tumor volverá a seleccionar células resistentes a docetaxel y será refractario a esta terapia. La resistencia a docetaxel puede ocurrir por procesos intrínsecos de la biología de PCa o por mecanismos generales de resistencia a drogas, comunes en distintos tipos de tumores (Antonarakis and Armstrong, 2011). Por un lado la resistencia podría deberse a una mala distribución de la droga, debido a la desorganización y flujo caótico de sangre en los vasos sanguíneos que se encuentran en las mediaciones del tumor (Kyle et al., 2007). Esta misma condición extracelular genera una situación de hipoxia en las células tumorales pobremente nutridas, induciendo una resistencia a drogas dependientes del ciclo celular y seleccionando fenotipos celulares aún más malignos (Heldin et al., 2004). Por otro lado la efectividad del docetaxel está limitada por su alta afinidad por la bomba de eflujo de drogas de membrana (glicoproteína P). Dicha bomba disminuye la concentración intracelular de esta droga. Las células que aumentan la síntesis de esta bomba dependiente de ATP se vuelven resistentes a docetaxel y a paclitaxel (Rowinsky et al., 1998). Esta resistencia es conferida por la sobreexpresión del gen de multiresistencia (MDR1) que codifica para la glicoproteína P (Borst et al., 2000). Otros mecanismos de resistencia a docetaxel posible son las alteraciones en la estructura o función de los microtúbulos. Mutaciones en el gen de la  $\beta$  tubulina podrían afectar la unión de la droga o aumentar el contenido de esta proteína (Berrieman et al., 2004).

La sobrevida media en pacientes con PCa metastásico y resistente a docetaxel, es menor a un año (Leo et al., 2011). En el 2010 la FDA aprobó como segunda línea quimioterapéutica en pacientes CRPC resistentes a docetaxel, a la terapia basada en cabazitaxel, otro taxol con alta afinidad a la tubulina. La combinación de cabazitaxel con prednisona fue el tratamiento que ofreció una mayor sobrevida en los pacientes que se encontraban en esta etapa de la enfermedad. Debido a la alta incidencia de neutropenia y muertes debido a neutropenia, consecuencia de este tratamiento, se recomienda la administración cautelosa y monitoreo apropiado en la administración de estos agentes (Paller and Antonarakis, 2011).

Hoy en día, sigue siendo crítico el desarrollo de nuevos agentes y combinaciones para el tratamiento de esta etapa de la enfermedad, buscando siempre mejorar las condiciones conseguidas con las terapias actuales.

El mayor conocimiento de la etapa CRPC permitió el crecimiento de una nueva era de desarrollo de drogas antitumorales con blancos moleculares específicos (Attard et al., 2006) muchas de las cuales actualmente se encuentran en ensayos clínicos.

*En este trabajo de tesis estudiaremos estrategias y combinaciones terapéuticas para el PCa independiente de andrógenos, utilizando drogas que modulan distintos procesos celulares. A continuación desarrollaremos las terapias recomendadas por el Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de Salud de los EE. UU., haciendo también referencia a los tratamientos descritos por el Instituto Nacional del Cáncer del Ministerio de Salud, Argentina.*

### 2.1 Distintos abordajes para el tratamiento del PCa

El tratamiento más adecuado para cada paciente, dependerá de varios factores siendo los principales el estadio del cáncer, el grado de *Gleason* del tumor, la edad, los síntomas y la salud del paciente en general.

Los tratamientos disponibles para el PCa según el Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de Salud de los EE. UU. son:

- Vigilancia activa o “active surveillance”
- Cirugía
- Radioterapia
- Terapia hormonal
- Quimioterapia

- **Vigilancia activa**

Este tratamiento puede ser propuesto por el médico en el caso de que el paciente sea diagnosticado en un estadio temprano de la enfermedad, en el que el tumor parecería crecer lentamente.

Se trata de no proceder con ningún tratamiento, mientras se controla el avance de la enfermedad mediante exámenes de PSA, DRE y biopsias. En el caso de que con alguno de estos exámenes se verifique el avance del cáncer, entonces se procederá a evaluar el o los mejores tratamientos para el paciente.

La vigilancia activa evita o retrasa los efectos secundarios de otras terapias como la cirugía o radiación, pero podría reducir la posibilidad de controlar el cáncer antes de que avance.

- **Cirugía**

Este tratamiento se aplica en el caso de que el tumor se encuentre localizado en la próstata en pacientes que estén atravesando estadios tempranos de la enfermedad. En algunos casos se puede realizar en pacientes con PCa avanzado con el objetivo de aliviar los síntomas. Se puede realizar una prostatectomía total o parcial dependiendo de la ubicación del tumor en la glándula, y generalmente se extirpan también los ganglios linfáticos cercanos.

Entre las desventajas posibles de este procedimiento podemos describir la recuperación luego de la operación, incontinencia urinaria, impotencia sexual e imposibilidad de la producción de semen. Estas consecuencias de la cirugía dependen de la habilidad del cirujano y de cada caso en particular y para la mayoría de ellas existen fármacos que permiten controlar estos efectos.

- **Radioterapia**

El objetivo de esta técnica es destruir las células que se encuentran bajo el área de tratamiento. Generalmente la aplicación de rayos de alta energía se realiza en estadios tempranos de la enfermedad, en los que el tumor se encuentra localizado. Se puede aplicar la radioterapia en lugar de realizar la prostatectomía, o se puede utilizar luego de la cirugía para destruir células tumorales que hubieran quedado en el área. En etapas avanzadas, se utiliza para aliviar el dolor de los pacientes.

Los efectos secundarios de esta terapia dependen principalmente del tipo y dosis de radiación. Entre los más comunes podemos destacar el cansancio, incontinencia, impotencia y sensibilidad en la zona de la piel desde la que se aplicaron los rayos.

- **Terapia hormonal**

El objetivo de esta terapia es disminuir los niveles de hormonas masculinas a nivel sistémico de modo de impedir el crecimiento de las células tumorales.

La terapia hormonal se aplica en pacientes con PCa avanzado, y en algunos casos en etapas tempranas de la enfermedad como terapia adicional a la cirugía o radiación.

Los principales productores de la testosterona son los testículos, y en menor cantidad la glándula suprarrenal. Se pueden distinguir dos formas de terapia hormonal, la utilización de fármacos o la cirugía de testículos (orquiectomía). Entre los fármacos utilizados podemos encontrar:

*Antiandrógenos:* bloquean la acción de las hormonas (por ejemplo flutamida),

*Agonistas LH-RH (agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante):* impiden que los testículos libren las hormonas (leuprolide)

*Fármacos que impiden que las glándulas suprarrenales produzcan testosterona (ketoconazol).*

Cuando el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo los médicos generalmente controlan el avance de la enfermedad con la terapia hormonal por varios años. Sin embargo, eventualmente, la mayoría de los cánceres se vuelven resistentes a la terapia hormonal y evoluciona hacia un estadio independiente de hormonas.

Los efectos secundarios de esta terapia afectan la calidad de vida del paciente. Entre ellos podemos describir impotencia, pérdida del deseo sexual, debilidad en los huesos, náuseas, crecimiento o sensibilidad de senos.

- **Quimioterapia**

La quimioterapia se aplica en estadios avanzados del PCa (CRPC) en los que la enfermedad no responde a la terapia hormonal.

En nuestro país, la primera línea de tratamiento quimioterapéutico en pacientes con CRPC es la combinación de docetaxel y prednisona, según el Instituto Nacional del Cáncer (Ministerio de Salud, Argentina). A partir del año 2004 en EE. UU. se aprobó el uso de la combinación de docetaxel y prednisona como terapia para pacientes con CRPC metastásico, luego de dos ensayos clínicos de Fase III que reportaron una mejora en la supervivencia de los pacientes (Tannock et al., 2004)(Petrylak et al., 2004). El **docetaxel** es un taxol extraído de la planta europea Yew *Taxus baccata*, que se une a la subunidad  $\beta$  de la tubulina, la cual es incorporada al citoesqueleto de los microtúbulos durante la fase G2/M del ciclo celular, inhibiendo la despolimerización de los mismos e induciendo de este modo la formación de haces de microtúbulos estables. Esta interrupción del equilibrio normal de los microtúbulos lleva a la muerte celular de las células en división (Verweij et al., 1994). La **prednisona** es un glucocorticoide sintético antiinflamatorio derivado de la cortisona. Actúa como agonista del receptor de

glucocorticoides e inhibe la infiltración leucocitaria interfiere con la función de los mediadores en la respuesta inflamatoria y suprime la respuesta inmune tumoral ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). Aunque el tratamiento con docetaxel tiene efectos paliativos y aumenta la sobrevida de los pacientes, no es la última respuesta para esta etapa del PCa debido a que eventualmente el tumor se vuelve resistente a este agente quimioterapéutico, o a que los pacientes no pueden tolerar por largo tiempo la toxicidad del mismo (Antonarakis and Armstrong, 2011).

Desde el Ministerio de Salud de Argentina, se recomienda no volver a exponer los pacientes que recibieron tratamiento con docetaxel a este agente, y se propone como segunda línea de quimioterapia en CRPC metastásico resistente a docetaxel, las combinaciones de **cabazitaxel** con prednisona. El cabazitaxel es otro taxol, que se une a la tubulina, pero que difiere del docetaxel en su baja afinidad por una bomba de eflujo de drogas dependiente de ATP, denominada glicoproteína P (Paller and Antonarakis, 2011). Las células que se vuelven resistentes a docetaxel, presentan alta expresión de esta glicoproteína, pero son sensibles a cabazitaxel. En 2010 la Administración de alimentos y drogas (FDA) aprobó el uso de cabazitaxel como una nueva opción para pacientes con CRPC metastásico resistente a docetaxel (Borst et al., 2000).

También se ha propuesto al **paclitaxel** como segunda línea terapéutica para CRPC resistente a docetaxel. Se ha comprobado en estudios clínicos que el paclitaxel combinado con carboplatino fue bien tolerado y que los pacientes presentaron una respuesta positiva de PSA y de sobrevida. Aun así, la evidencia clínica publicada no es suficiente, por lo que esta combinación y otras siguen siendo estudiadas a nivel clínico y pre clínico (Jeske et al., 2011) (Sella et al., 2009).

Debido a que existe una falta de sustento para indicar una tercera línea de quimioterapia, se aconseja alentar a los pacientes en esta etapa de la enfermedad a la participar de ensayos clínicos.

El compromiso metastásico en el PCa avanzado es principalmente óseo, y ocurre en el 80% de los casos. Entre eventos los esqueléticos relevantes en la metástasis a hueso, podemos describir la compresión medular, la invasión en la pelvis y en costillas (Coleman et al., 2005). El Ministerio de Salud recomienda el uso de **ácido zoledrónico** en pacientes con enfermedad ósea metastásica secundaria en CRPC. El ácido zoledrónico es un bifosfonato que actúa adhiriéndose al hueso, interrumpiendo la degradación excesiva del mismo y reequilibrando el proceso de remodelación natural. Es

una droga bien tolerada en pacientes, disminuye el dolor y retrasa la aparición de los eventos esqueléticos (Saad et al., 2006).

### **Ensayos clínicos actuales en PCa**

La investigación ha mejorado la detección, el tratamiento y la expectativa de vida del paciente con PCa. Se espera que nuevas investigaciones ofrezcan a más hombres ser tratados exitosamente. En todo el mundo, se están llevando a cabo ensayos clínicos evaluando nuevas estrategias de terapia en los que se incluyen, radioterapia, hormonoterapia y quimioterapia.

Se pueden encontrar varios trabajos de ensayos clínicos en la base de datos del Instituto Nacional del Cáncer (EE. UU), como por ejemplo: *Evaluation of Safety of Cabazitaxel (Jevtana) in Patients With Metastatic Hormone Refractory Prostate Cancer: Fase III*. El objetivo es evaluar la seguridad del tratamiento con cabazitaxel en CRPC, en combinación con prednisona oral.

- *STAMPEDE: Systemic Therapy in Advancing or Metastatic Prostate Cancer: Evaluation of Drug Efficacy: A Multi-Stage Multi-Arm Randomized Controlled Trial. Fase III*. En este ensayo aplican 5 tratamientos que se utilizan actualmente para PCa avanzado (ácido zoledrónico, docetaxel, celecoxib, abiraterona y radioterapia), pero en combinación con el tratamiento hormonal y en estadios tempranos de la enfermedad.
- *Triptorelin, Flutamide, and External-Beam Radiation Therapy or External-Beam Radiation Therapy Alone in Treating Patients With Stage II or Stage III Prostate Cancer. Fase III*. En este estudio, se combinará la terapia hormonal (triptorelina y flutamida, inhiben la producción de andrógenos desde las glándulas adrenales) con la radioterapia. Se compararan los efectos de la terapia combinada, con los efectos de la radioterapia solamente. En estadios avanzados de PCa.

Como podemos observar a partir del ejemplo de tres ensayos clínicos, aún se estudia la efectividad y seguridad del uso de los agentes que fueron aprobados para el tratamiento de PCa. Por un lado el docetaxel, primera línea terapéutica, continúa en estudio debido a la resistencia que el tumor genera a esta droga. Se busca combinarlo con otras terapias de modo de actuar de forma más agresiva sobre el tumor y tratar de retrasar este mecanismo no deseado. Por otro lado se busca combinar al cabazitaxel, segunda línea quimioterapéutica, con otro agente de modo de generar una terapia dirigida que permita mejorar la sobrevida de los pacientes en esta etapa.



Esta tercera línea quimioterapéutica que abarca a los ensayos clínicos describe al tratamiento del PCa como un proceso que todavía se encuentra en desarrollo e investigación. Debido a la resistencia que adquieren las células tumorales a la terapia hormonal y luego al docetaxel, es imprescindible la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el estadio avanzado de esta enfermedad.

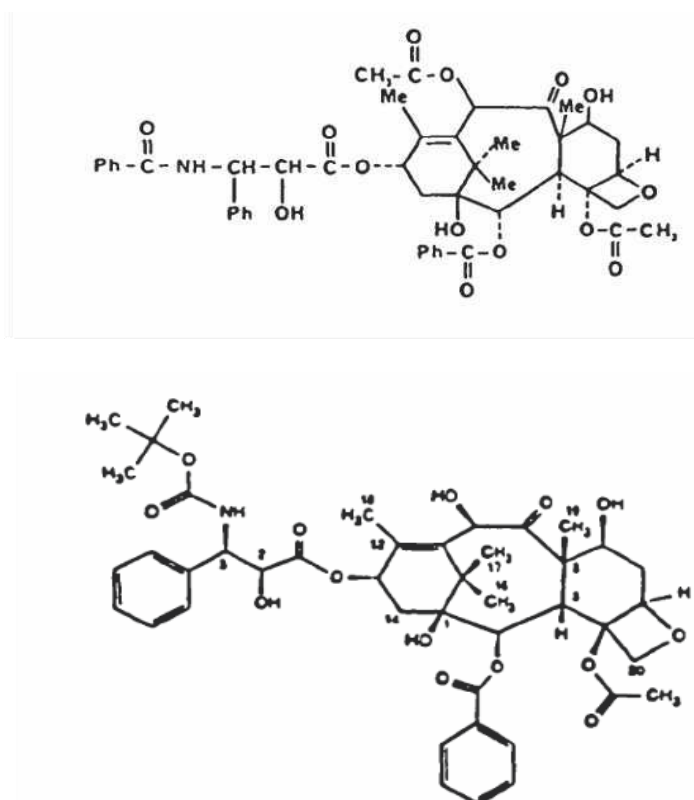
*En este trabajo de tesis se investigarán distintas drogas y sus combinaciones con el objetivo de proponer nuevas terapias posibles para CRPC. Entre las drogas utilizadas se encuentran el **paclitaxel**, un taxol que no comparte los mecanismos de resistencia que adquieren los tumores frente al docetaxel; el **flavopiridol**, un flavonoide semisintético que inhibe el ciclo celular; el **CPS49**, un análogo de la talidomida con una gran actividad antiangiogénica, y el **olaparib**, inhibidor de PARP, que en aquellas células con una actividad de BRCA1 deficiente, induce muerte celular. En el próximo capítulo describiremos las características principales de cada uno de estos agentes y los estudios pre-clínicos y clínicos en PCa.*

## **CAPÍTULO III**

# **AGENTES ANTITUMORALES PARA EL CRPC UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO**

### 3.1 El paclitaxel como tratamiento para PCa

El primer taxol utilizado como quimioterapéutico para el tratamiento del cáncer fue el paclitaxel. En 1992, la FDA aprobó su uso en cáncer de ovario refractario (Trimble et al., 1993).



**Figura 7. Estructura química de paclitaxel (arriba) y docetaxel (abajo).** La fórmula química de paclitaxel es  $C_{47}H_{51}O_{14}$ . Este agente es altamente lipofílico e insoluble en agua. El docetaxel difiere del paclitaxel en dos posiciones en su estructura química y esto lo hace más soluble en agua que el primero. La fórmula química del docetaxel es  $C_{43}H_{53}NO_{14}$ .

El paclitaxel, como el docetaxel, se une a la subunidad  $\beta$  de la tubulina, preferencialmente en microtúbulos que en dímeros de tubulina. Al unirse inhibe la despolimerización de los microtúbulos, induciendo la formación de microtúbulos estables, lo que lleva a la muerte celular (Manfredi and Horwitz, 1984).

Tanto el paclitaxel como el docetaxel son prescritos como agentes antineoplásicos para una gran cantidad de enfermedades como el cáncer de pulmón, de mama, de próstata, de esófago, de vejiga, entre otros (Yared and Tkaczuk, 2012). Aunque ambos agentes son clínicamente activos, su uso genera varios efectos no deseados que impiden el uso continuo de los mismos como terapia. Varios de los efectos secundarios están asociados a los solventes que se utilizan para diluir estos compuestos. El paclitaxel es diluido en 50% de Cremophor y en 50% de alcohol, para su uso clínico (Verweij et al., 1994). Entre los efectos secundarios más comunes podemos encontrar reacciones de hipersensibilidad y neuropatía periférica.

El uso de paclitaxel en CRPC resistente a docetaxel fue clínicamente evaluado en distintos ensayos clínicos (Jeske et al., 2011).

Estudios en pacientes con CRPC que fueron tratados previamente con docetaxel, demostraron que el tratamiento combinado de paclitaxel y carboplatino como segunda línea terapéutica, fue bien tolerado, redujo el valor de PSA en los pacientes y aumentó el porcentaje de supervivencia (Jeske et al., 2011)(Cabrespine et al., 2006). Debido a la eficacia en estos tratamientos, se concluye que no existe una resistencia cruzada entre el docetaxel y el paclitaxel. Más aún, estudios en cáncer de mama mostraron que la resistencia a docetaxel no implica resistencia a otras terapias basadas en taxoles (Taguchi et al., 2004; Valero et al., 1998). Esta particularidad podría deberse a que ambos agentes se unen a distintos sitios de la tubulina, por lo que una mutación puntual no implicaría la resistencia al otro agente (Snyder et al., 2001).

Con la emergencia del cabazitaxel en 2010 como segunda línea de quimioterapia para CRPC, el uso de paclitaxel todavía es incierto, ya que se necesitan más estudios que demuestren que este agente es aún más efectivo que el cabazitaxel y que su uso tiene menores efectos secundarios en los pacientes.

*En este trabajo de tesis con el objetivo de mejorar las terapias actuales se estudiarán los efectos de la combinación de paclitaxel con el CPS49, un potente inhibidor de la angiogénesis, utilizando bajas dosis de ambas drogas de modo de disminuir los efectos tóxicos en los pacientes.*

### **3.2 El ciclo celular como blanco terapéutico para el cáncer de próstata: flavopiridol**

El ciclo celular representa una serie de eventos íntimamente relacionados que permiten a la célula crecer y proliferar, y regula la división celular protegiendo a la célula del daño al ADN. Uno de los elementos críticos de la maquinaria del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), que al activarse permiten a la célula el pasaje de una fase a otra en el ciclo. Estas proteínas son reguladas positivamente por ciclinas y negativamente por inhibidores de CDK naturales.

Las células tumorales presentan una desregulación del ciclo en la que se sobre-expresan ciclinas o se inhibe la actividad de CDK inhibitorias, por lo que la célula tumoral crece de forma no regulada.

El arresto en el ciclo también representa un mecanismo de sobrevida que permite a la célula reparar el daño que hubiera en el ADN. Si el ciclo continúa sin haber sido reparado el ADN, se activa la cascada de señalización apoptótica, llevando a la célula a la muerte (Johnson and Walker, 1999).

El uso de agentes quimioterapéuticos que tengan como blanco el ciclo celular, en particular las CDKs, está basado en la teoría en la que la inhibición de CDKs podría arrestar el ciclo celular, facilitando la inducción a la apoptosis. La inhibición de las CDKs por estos compuestos podría deberse a un efecto directo sobre la unidad catalítica de estas proteínas como a un efecto indirecto mediado las vías regulatorias de la actividad de las CDKs. Por otro lado, se ha descrito que estos agentes también tienen la capacidad de inhibir la transcripción, ya que las proteínas responsables de fosforilar el dominio C terminal de la ARN polimerasa II, son las CDKs 1, 7, 8 y 9 (Oelgeschlager, 2002). La inhibición de la transcripción podría contribuir a los efectos pro apoptóticos de estos agentes (Koumenis and Giaccia, 1997).

El flavopiridol (L86-8275) es un flavonoide semisintético derivado de un alcaloide que se obtiene de una planta de la India (Figura 8A). Este agente antineoplásico es clasificado como el mejor inhibidor de CDKs debido a su alta afinidad por estas proteínas y su habilidad para inducir arresto en el ciclo celular en varias líneas celulares (Losiewicz et

al., 1994). Se une e inhibe directamente a CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 y CDK9, induciendo arresto en fase G1/S y G2/M (Figura 8B) (Schwartz and Shah, 2005).

Se ha descrito que la administración de flavopiridol induce apoptosis en líneas celulares hematopoyéticas mediante la activación de la proteína MAPK (Cartee et al., 2001) e inhibe moléculas antiapoptóticas como bcl-2, XIAP, p21<sup>CIP1;WAF</sup>, mcl-1, ciclina D1 (Schwartz and Shah, 2005). También se ha reportado que el flavopiridol es un potente inhibidor del complejo Ciclina T1/CDK9, resultando en la reducción de la eficiencia de la elongación transcripcional, lo que lleva a la disminución de ARN mensajeros de corta vida, entre los que se encuentran genes que promueven la proliferación celular (ciclina D1) y genes que inhiben la apoptosis (mcl-1 y XIAP) (Lam et al., 2001).

Ensayos preclínicos en los que se evalúa el efecto de flavopiridol arrojaron resultados positivos respecto al uso de esta droga como agente anti-terapéutico en PCa. Estos estudios demostraron que el flavopiridol presenta un alto potencial anti-proliferativo en tumores xenotransplantados y un alto potencial selectivo en células prostáticas comparado con células de melanoma (Drees et al., 1997).

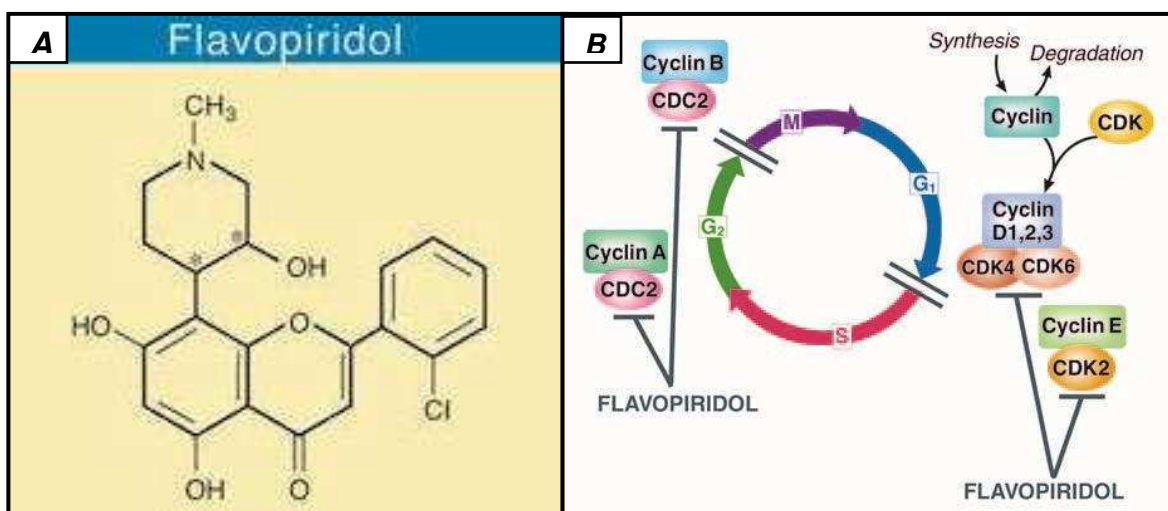
En particular, se describió el efecto del flavopiridol en la viabilidad de células PC3. Esta línea celular es una línea tumoral prostática, andrógeno independiente, que fue establecida de una adenocarcinoma prostático humano con metástasis a hueso. El tratamiento con 2 a 4  $\mu$ M de flavopiridol disminuye la viabilidad celular en un 30%. Asimismo el tratamiento con 10 mg/kg/día de flavopiridol redujo el crecimiento de tumores xenotransplantados originados a partir de la inoculación de PC3 en ratones nude (Jiao et al., 2008).

Se demostró mediante un microarreglo de cDNA llevado a cabo en cuatro líneas celulares de PCa, entre las que se encuentra PC3, que el tratamiento con flavopiridol genera un perfil de expresión génica específico. Los 209 genes modulados por flavopiridol se encuentran involucrados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, transducción de señales, transcripción, adhesión celular, estructura celular, apoptosis (Lu et al., 2004).

Debido a la alentadora evidencia preclínica del flavopiridol en PCa, se realizaron ensayos clínicos de Fase 1 y 2 en pacientes con CRPC tratados con flavopiridol solamente. Lamentablemente los estudios arrojaron resultados desalentadores respecto al uso de esta droga como único agente en el tratamiento de CRPC, en las dosis y el protocolo evaluado. No se evidenciaron efectos clínicos relevantes y los efectos tóxicos secundarios al tratamiento fueron desfavorables. Entre ellos los más comunes fueron náuseas y diarrea. Por lo que se recomienda su evaluación en combinación con otros agentes terapéuticos (Liu et al., 2004).

Otros estudios preclínicos demostraron que el flavopiridol aumenta la inducción de apoptosis generada por paclitaxel en líneas tumorales mama y que esta inducción es altamente dependiente del orden en el que se apliquen las drogas. Este régimen resulta en la inhibición de la actividad del complejo CDK/ciclina B1 y un consecuente aumento en la apoptosis (Motwani et al., 2003).

Se concluye entonces que el orden de aplicación de las drogas dependerá de las características de la línea celular de PCa, como ser la dependencia a andrógenos y la expresión de proteínas inherentes a cada línea celular. Debido a que los tumores consisten en una población heterogénea de tipos celulares, se sugiere que cualquiera de las combinaciones podría funcionar para inhibir o retrasar el crecimiento tumoral e inducir apoptosis (Gomez et al., 2006).



**Figura 8. A. Estructura química del flavopiridol. B. Efectos del flavopiridol en el ciclo celular (Schwartz and Shah, 2005).**

A partir de estas evidencias preclínicas, se llevó a cabo un ensayo de Fase I en el que se estudió el tratamiento combinado de flavopiridol y paclitaxel en pacientes con tumores sólidos en estadios avanzados. En este estudio se logró aplicar un esquema de tratamiento de flavopiridol que logró reducir las altas toxicidades generadas por flavopiridol, así como se pudo observar una actividad clínica favorable en pacientes con distintos tumores, entre los que se encontraban pacientes con CRPC, refractarios a tratamiento con taxoles. Se sugiere que el flavopiridol podría ser utilizado como un potenciador de la quimioterapia (Schwartz et al., 2002).

*En base a las evidencias preclínicas y clínicas aquí presentadas, en este trabajo de tesis se estudiará en modelos in vitro e in vivo de PCa el efecto de bajas dosis de flavopiridol combinado con CPS49, un análogo de la talidomida, o con paclitaxel.*

### **3.3 El estrés oxidativo y la inhibición de la angiogénesis como blanco terapéutico para el PCa: análogos de talidomida.**

El desarrollo de la angiogénesis es requerida para permitir el crecimiento continuo de los tumores. Se ha observado una intensa neovascularización alrededor de los tumores, y en el caso de no haberla, los tumores no crecen más de 2 o 3 mm de diámetro. Una vez que las células tumorales son capaces de reclutar su propio suministro de sangre, pueden expandirse y metastizar (Kluetz et al., 2010).

En el PCa, el proceso angiogénico tiene un rol crítico. Distintos estudios correlacionan marcadores de angiogénesis con una etapa metastásica de la enfermedad, un alto grado de *Gleason* y un peor pronóstico. Se observó que la densidad microvesicular era significativamente mayor en muestras de pacientes con enfermedad metastásica, comparado con aquellas muestras de pacientes con enfermedad confinada a la glándula (Weidner et al., 1993). Más aún se ha descrito que el nivel del factor de crecimiento vascular endotelial o VEGF tumoral en suero era mayor en pacientes con enfermedad metastásica (Duque et al., 1999). Así como también se describió que el factor inducible por hipoxia o HIF, que actúa como mediador de la expresión de VEGF, presenta mayor



expresión en tejidos tumorales prostáticos comparado con tejidos prostáticos normales (Du et al., 2003). Basándose en estas evidencias, la inhibición de la angiogénesis se ha convertido en un blanco terapéutico interesante para el tratamiento del PCa.

La talidomida ( $\alpha$ -N- phtalimido- glutarimida) (Figura 9) es un agente antitumoral con eficacia en distintas enfermedades y es actualmente utilizada en el tratamiento de múltiple mieloma.

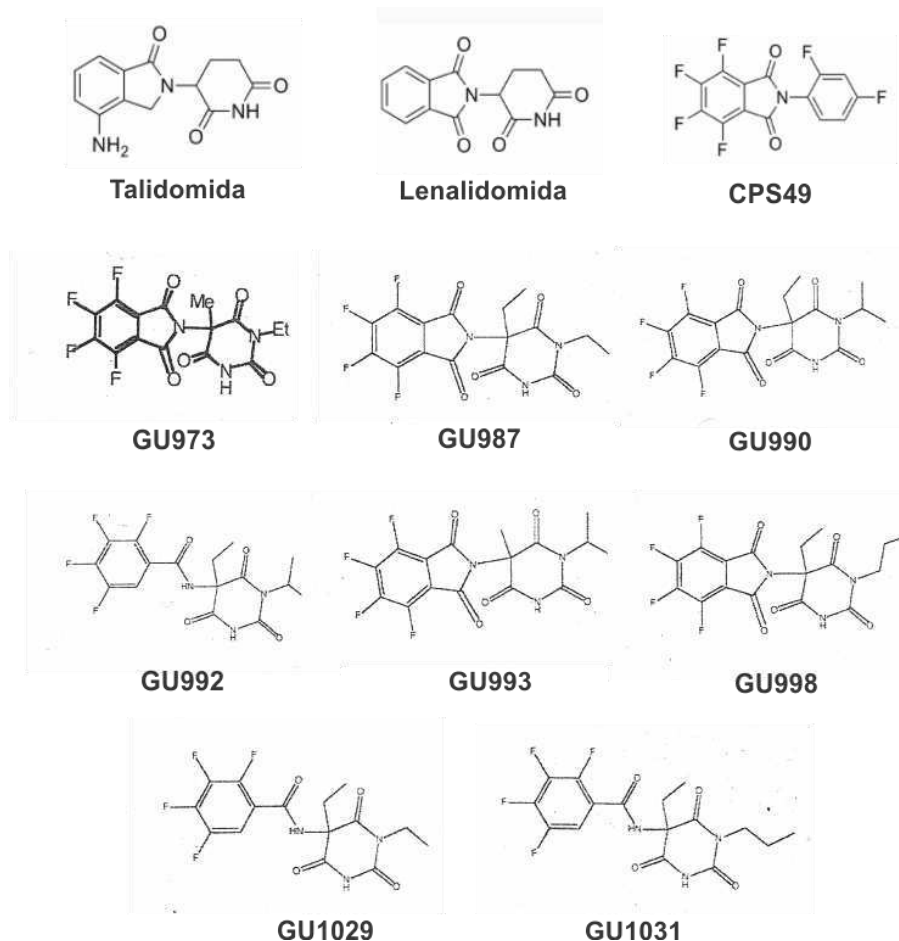
Fue utilizado como sedativo en 1956, para mejorar las náuseas matutinas de las embarazadas. Luego se confirmó que la talidomida presentaba efectos teratogénicos y causaba malformaciones congénitas en los bebés de las mujeres que habían utilizado esta droga, por lo que es retirada del mercado (Lenz and Knapp, 1962).

En 1994 se describe que la talidomida tiene la capacidad de inhibir la angiogénesis en un ensayo *in vitro* (D'Amato et al., 1994). Luego es aprobada por la FDA en 1998 para el tratamiento de eritema leproso, y en 2006 para el tratamiento del mieloma múltiple, debido a su propiedad antiangiogénica y anti-inflamatoria. Debido a estas propiedades, se postuló que la talidomida podría ser un prometedor agente terapéutico en el tratamiento del cáncer.

Se realizaron ensayos clínicos de fase II, evaluando el efecto de la talidomida en pacientes con CRPC. Se observó una reducción en el nivel de PSA en suero y una mejora en los síntomas clínicos (Figg et al., 2001). También se evaluó la eficacia del tratamiento de la talidomida en combinación con otros agentes citotóxicos, como el docetaxel, estramustina y otros taxoles, en los que se observó una buena actividad antitumoral (Figg et al., 2007). Los efectos secundarios observados, como eventos trombóticos, fatiga y neuropatía asociados a talidomida, llevaron al desarrollo de análogos con el objetivo de mejorar la actividad antiangiogénica del compuesto y reducir los efectos tóxicos.

El grupo del Dr. William Figg (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda), colaborador de nuestro laboratorio, describió al producto de biotransformación de la talidomida como el responsable de la actividad antiangiogénica del agente (Price et al., 2002). Basándose en la estructura del metabolito, se sintetizaron 118 análogos, que fueron estudiados en su capacidad de inhibir angiogénesis en

ensayos *in vitro*. Dentro de estos análogos el que resaltó por tener el mayor potencial antiangiogénico *in vivo* e *in vitro* fue el CPS49, un análogo tetrafluorinado de la talidomida (Figura 9).



**Figura 9. Estructura química de la talidomida y los análogos utilizados en este trabajo de tesis.** Las estructuras de la talidomida y de los análogos lenalidomida y CPS49 fueron adaptadas de la publicación (Aragon-Ching et al., 2007a). Las estructuras del resto de los análogos fueron obtenidas del Dr. William Figg (NCI, NIH, EE.UU.) quien sintetizó los compuestos

Otros grupos han desarrollado distintos análogos y se llegó a la identificación de dos grandes clases de análogos de la talidomida basándose en la diferencia en el patrón de secreción de quemoquinas en el ensayo de estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) con un liposacárido (LPS) (Corral and Kaplan, 1999).

La primera clase de análogos, denominada SelCiD (drogas inhibitorias de citoquinas seleccionadas) inhiben TNF-  $\alpha$ , pero tienen un efecto modesto en la producción de IL-10 en PBMC inducido por LPS y en la activación de células T. El rol más prometedor de esta clase de análogos parecería ser como agentes anti inflamatorios (Aragon-Ching et al., 2007a). La segunda clase de análogos denominada IMiD (drogas inmunomoduladoras), demostró una potente inhibición de TNF- $\alpha$ , como de quemoquinas proinflamatorias y apoptóticas, sin evidencias pre clínicas de teratogenia (Bartlett et al., 2004). Estos compuestos son potentes coestimuladores de células T que fueron parcialmente activadas por el receptor T, en células CD8+ y activan células natural killer, mejorando la inmunidad del huésped contra células tumorales (Corral et al., 1999). Esta clase comprende los compuestos que podrían ser utilizados como potentes agentes antitumorales. Representativos de esta clase son la lenalidomida, y los compuestos desarrollados por el grupo del Dr. William Figg: CPS49 y los análogos GU973, GU987, GU990, GU992, GU993, GU998, GU1029 (Figura 9).

La lenalidomida es un análogo inmunomodulador que ha demostrado tener mayor potencia que la talidomida en ensayos de proliferación y formación de tubos *in vitro* (Tohnya et al., 2004a), así como en efectos anti-migratorios e inhibición del crecimiento tumoral en ensayos *in vivo* (Raje and Anderson, 2002). La lenalidomida fue estudiada en un ensayo clínico de fase I como único agente en pacientes con tumores sólidos refractarios. En este ensayo se observó una estabilización de la enfermedad y una buena tolerabilidad de la droga (Tohnya et al., 2004b). Se han llevado a cabo distintos ensayos clínicos de fase I en los que se estudia el efecto antitumoral de la combinación de lenalidomida con otros agentes quimioterapéuticos como docetaxel, prednisona, paclitaxel en pacientes con CRPC. Los resultados no fueron muy alentadores, encontrando una respuesta antitumoral parcial o mínima, con altas toxicidades dependientes de la dosis.

Uno de los análogos tetrafluorinados de la talidomida, el CPS49 (Cellegene. Inc), perteneciente al grupo de la clase IMiD, ha demostrado tener una gran potencia y efecto anti-angiogénico en ensayos *in vitro*, y particularmente demostró tener efecto citotóxico en líneas celulares de PCa. El tratamiento con 25-200  $\mu$ M de CPS49 disminuyó significativamente la proliferación de la línea LNCaP. Sin embargo en la línea PC3, fue necesaria una concentración de 200  $\mu$ M para lograr una disminución significativa de la

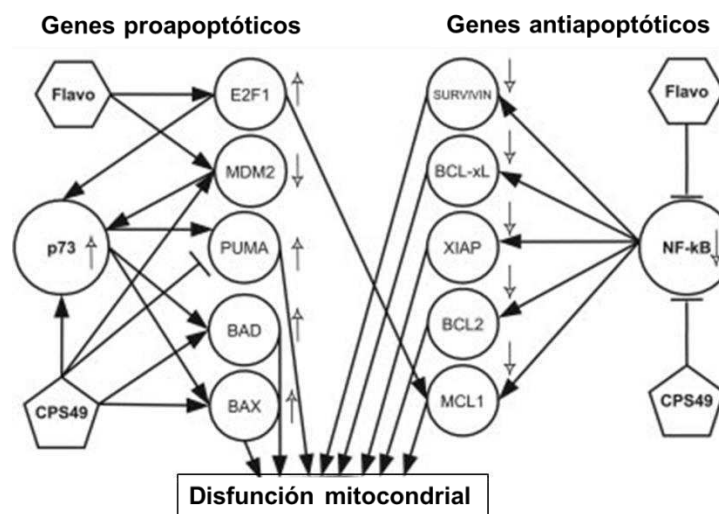
proliferación (Ng et al., 2003). Con el objetivo de evaluar los efectos *in vivo* del CPS49, el grupo del Dr. Figg realizó un estudio de toxicidad, en el cuál se determinó que la dosis máxima tolerable en ratones nude es de 12,5 mg/Kg/día intraperitonealmente durante 2 semanas (Ng et al., 2003). A partir de estos resultados se evaluó el efecto antitumoral de este análogo en animales xenotransplantados con tumores originados a partir de líneas celulares PC3 o 22RV1. Los resultados indicaron que el tratamiento con CPS49 induce la inhibición del crecimiento tumoral de forma prominente en los tumores originados a partir de la línea PC3 y de forma modesta en aquellos originados a partir de la línea 22RV1. Asimismo se evaluó el efecto anti-metastásico del CPS49 en estos animales, observando una significativa reducción de las metástasis en pulmón (Ng et al., 2004).

Un trabajo publicado en 2006 propuso un mecanismo de acción que permite explicar el efecto citotóxico y antiangiogénico del CPS49. Dicho trabajo demostró que el tratamiento con CPS49 en células PC3, endoteliales y fibroblastos, induce la activación de la proteína p38, un miembro importante de la familia de MAPK que se activa frente al estrés celular, conduciendo a dichas células a apoptosis (Warfel et al., 2006). Por otro lado se ha descrito que la inhibición de esta proteína aumenta los niveles de VEGF *in vitro* e *in vivo* (Issbrucker et al., 2003). De esta forma se estima que la activación de p38 por CPS49 podría contribuir también a los efectos antiangiogénicos de este agente.

El CPS49 fue también evaluado como posible terapia en leucemia, y se lo ha descrito como perteneciente a un grupo de análogos de talidomida con actividad redox. Los análogos de talidomida tienen la capacidad de amplificar rápidamente las ROS intracelular. El aumento de ROS está relacionado con un aumento de calcio intracelular, la disipación del potencial de membrana de la mitocondria y la disrupción de la estructura de la membrana mitocondrial, llevando a la muerte celular (Ge et al., 2006). Esta citotoxicidad es altamente selectiva para líneas celulares de leucemia, comparado con el resto de las líneas celulares mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La capacidad de los análogos de talidomida de aumentar los niveles de ROS, sumada a la mayor frecuencia de mutaciones presentes en el ADN de la mitocondria, generan un nuevo blanco terapéutico interesante para estudiar en combinación con otras drogas o en otros tipos de tumores. Nuestro laboratorio, en colaboración con el Dr. Kevin Gardner (NCI, Bethesda, USA) investigó el efecto de la combinación del CPS49 con el flavopiridol

en líneas celulares de leucemia. Se observó que dicha combinación induce citotoxicidad selectiva sinérgica asociada a un aumento de ROS y una disfunción mitocondrial en células de leucemia. Ambas drogas actúan en conjunto activando un programa de transcripción específico que modula la actividad de NF- $\kappa$ B, E2F1 y p73, que promueven la inestabilidad mitocondrial, aumentando la expresión de factores pro-apoptóticos y suprimiendo la expresión de los factores antiapoptóticos (Figura10) (Ge et al., 2008).



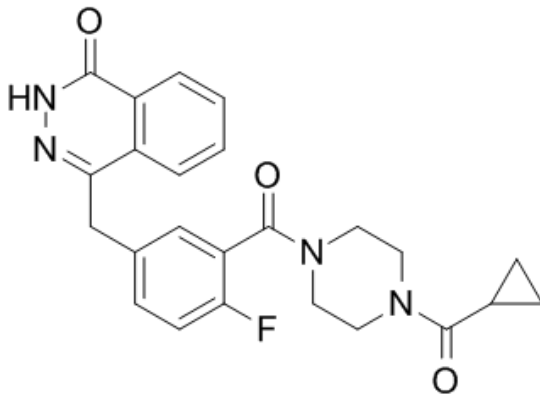
**Figura 10: La combinación de flavopiridol y CPS49 generan daño mitocondrial mediante distintos mecanismos que promueven la apoptosis en células de leucemia. El flavopiridol y el CPS49 aumentan los niveles de p73, lo cual aumenta la transcripción de genes proapoptóticos mediando así la disfunción mitocondrial. Por otro lado ambos agentes inducen la muerte celular inhibiendo NF-Kb y reprimiendo genes antiapoptóticos. Esta figura fue adaptada de (Ge et al., 2008).**

En base a los resultados alentadores que proponen al CPS49 como un potencial quimioterapéutico para el PCa, en este trabajo de tesis nos propusimos estudiar el efecto de las bajas dosis de CPS49, GU973, GU987, GU990, GU992, GU993, GU998 y GU1029 como posibles agentes antitumorales para el PCa, utilizándolos como mono droga, o combinados con otros agentes.

### 3.4 Inhibición de PARP en células deficientes en BRCA1 como posible terapia para el PCa: olaparib.

El Olaparib (AZD-2281) es un agente quimioterapéutico (Figura 11) desarrollado por AstraZeneca, que inhibe a la enzima polimerasa poly ADP ribosa (PARP). PARP1 está

involucrado en el cuidado y mantenimiento de la integridad genómica y tiene un rol crítico en la reparación del ADN luego de un daño en una sola hebra de ADN (SSBs) (de Murcia et al., 1997; Schreiber et al., 2006; Wang et al., 1997).



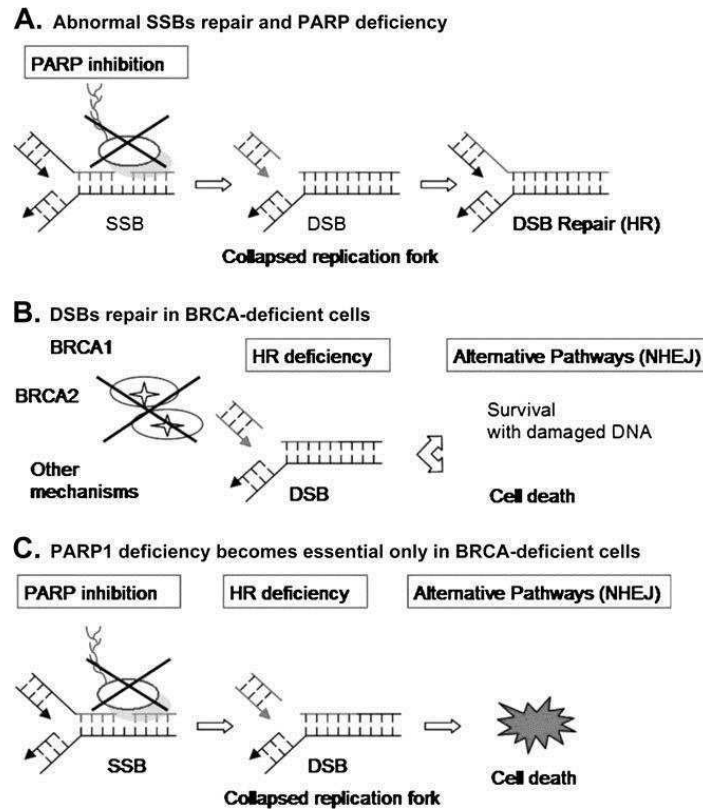
**Figura 11. Estructura química del olaparib** (Senra et al., 2011).

Entre las alteraciones en el ADN podemos encontrar a las alteraciones SSBs o a las que implican el corte en las dos hebras de ADN denominadas DSBs. La reparación de las primeras involucran a enzimas pertenecientes a la familia PARP, donde PARP1 es la más importante y su función es unirse al SSBs y reclutar otras proteínas reparadoras del (Ame et al., 2004)(Otto et al., 2005). En cambio los daños DSBs son reparados generalmente por la maquinaria que involucra al mecanismo de recombinación homóloga (HR), que presenta baja tasa de error, y al mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ) que es más propenso al error y a producir inestabilidad genética (Hoeijmakers, 2001).

La inhibición de la actividad de PARP afecta la reparación de SSBs, induciendo a la célula a utilizar otras vías de reparación. En el momento de la replicación del ADN, estos SSBs serán convertidos a DSB y reparados por HR (Figura 12A).

Por otro lado las proteínas BRCA1 y BRCA2 tienen un rol crítico en la reparación del ADN mediante HR (Tutt and Ashworth, 2002)(Gudmundsdottir and Ashworth, 2006). Así las células deficientes en BRCA1 deben reparar el daño DSBs vía NHEJ con altas chances de generar inestabilidad genómica (Figura 12B). Estas células, expuestas a inhibidores de PARP, como el olaparib, convertirían los SSBs en DSBs en la replicación,

pero al no tener el mecanismo de HR, deberían reparar los daños mediante NHEJ, aumentando las alteraciones cromosómicas y llevando a la muerte celular (Figura 12C) (Underhill et al., 2011).



**Figura 12: A. Reparación del daño en una hebra del ADN (SSBs) con inhibición de PARP:** la inhibición de PARP causa aumento en SSBs, que luego en la replicación serán convertidos en DSBs (daño en las dos hebras) y reparados por recombinación homóloga (HR). **B. Reparación de DSBs en células deficientes en BRCA1:** estas células son incapaces de reparar el DSBs ya que tienen deficiencia en el mecanismo de RH. **C. La inhibición de PARP se vuelve esencial solamente en células deficientes en BRCA1.** El aumento de SSBs, acumulación de DSBs en células que tienen el mecanismo de HR deficiente, expuestas a inhibidores de PARP son incapaces de mantener la integridad del genoma y se vuelven no viables. Esta figura fue extraída de (Underhill et al., 2011).

En base a estos descubrimientos apareció un nuevo concepto con aplicación clínica: *synthetic lethality* o mortalidad sintética (Farmer et al., 2005), descrito por Dobzhansky (Dobzhansky, 1946). Este concepto se refiere a la situación en la que la mutación en uno o dos genes individualmente no induce muerte celular, pero cuando se combinan las

mutaciones se induce la muerte celular. Así podemos afirmar que este nuevo concepto es aplicable a las células tumorales en las que mutaciones en BRCA1 o en algún gen crítico para la HR, sensibiliza las células al tratamiento con inhibidores de olaparib, induciendo la muerte celular de las mismas.

Comenzó a estudiarse en ensayos clínicos la aplicación de olaparib en pacientes de cáncer de mama que presentaban mutaciones en BRCA1 o BRCA2. Estos ensayos arrojaron resultados alentadores, en los que se describió que los inhibidores de PARP son extremadamente bien tolerables, inhiben PARP y presentan actividad antitumoral en estos tumores (Fong et al., 2009). Así también otros ensayos clínicos indican que estos compuestos tienen actividad anti tumoral en tumores deficientes en BRCA1 y BRCA2 en PCa, mama y ovario (Audeh et al., 2009; Barreto-Andrade et al., 2011; Tutt et al., 2009).

*A partir de estos antecedentes en este trabajo de tesis decidimos abordar el estudio del tratamiento con olaparib en células de PCa, con el propósito de investigar si los diferentes niveles de expresión de BRCA1 en estas líneas generan una sensibilidad diferencial al inhibidor de PARP.*



# **HIPÓTESIS Y**

# **OBJETIVOS**

El presente trabajo de tesis se basa en la siguiente hipótesis: **el estudio de la respuesta antitumoral de distintas combinaciones de agentes nos permitirá seleccionar una terapia más específica y eficaz para el PCa.**

En base a esto, el objetivo general de este trabajo de tesis fue **investigar la eficacia y el mecanismo de acción de la combinación de distintos compuestos como una estrategia terapéutica para el PCa independiente de andrógenos.**

Como objetivos específicos nos propusimos:

**1. Estudiar la citotoxicidad y el mecanismo de acción de la combinación de CPS49 y flavopiridol en líneas celulares de PCa.**

El flavopiridol y el CPS49 son compuestos con marcada actividad antitumoral en líneas celulares de PCa. Sin embargo, estas drogas mostraron efectos colaterales nocivos en los ensayos pre-clínicos y/o clínicos cuando se los administraba como únicos agentes. Previamente demostramos que la combinación de ambas drogas presenta citotoxicidad selectiva en células leucémicas. Sin embargo, el mecanismo de acción específico no se conoce. Por lo tanto, estudiaremos la selectividad de los compuestos en un panel de líneas celulares de PCa e investigaremos los mecanismos de acción que regulan la respuesta a estas drogas.

**2. Investigar el efecto *in vivo* de la combinación de CPS49 y flavopiridol sobre el crecimiento tumoral de próstata independiente de andrógenos.**

Ha sido reportado que altas dosis de CPS49 produce inhibición del crecimiento tumoral en ratones nude inyectados con la línea celular PC3 y tratados con el compuesto (Ng et al., 2004). Se sabe que el flavopiridol produjo resultados positivos en estudios de pacientes con PCa. Sin embargo, ambos compuestos producen efectos colaterales nocivos. Por lo tanto, nos propusimos estudiar la combinación de ambas drogas en dosis bajas para reducir los efectos colaterales y tóxicos, aumentando los efectos selectivos hacia el tumor de próstata en xenotransplantes.

**3. Investigar la eficacia de la combinación de CPS49 y paclitaxel para la terapia del PCa avanzado en estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*.**

El paclitaxel (análogo del docetaxel) es un quimioterapéutico que actualmente se lo utiliza para el tratamiento del PCa avanzado y que está siendo probado en ensayos clínicos de pacientes en combinación con otros agentes. Por lo tanto, nos propusimos estudiar en modelos *in vitro* e *in vivo* de PCa la eficacia de la combinación de CPS49 y paclitaxel.

#### **4. Estudiar la eficacia de nuevos análogos de talidomida como posibles agentes terapéuticos para el PCa.**

El laboratorio del Dr. Figg, colaborador de este proyecto, generó nuevos análogos estructurales de talidomida con el objetivo de disminuir los efectos tóxicos de los análogos desarrollados anteriormente y de aumentar su capacidad antitumoral. Debido a la potente actividad antiangiogénica y antitumoral que demostró tener la talidomida y los efectos antitumorales encontrados al combinar el CPS49 con flavopiridol, se decidió estudiar el efecto de estos nuevos análogos combinados con flavopiridol en células de PCa.

#### **5. Estudiar el efecto del olaparib sobre las distintas líneas celulares de PCa con diferentes niveles de expresión de BRCA1, luego de la combinación con otros compuestos.**

El olaparib inhibe a la enzima PARP, involucrada en el cuidado y mantenimiento de la integridad genómica, que cumple un rol crítico en la reparación del ADN luego de SSB. La inhibición de PARP induce a la célula a utilizar otras vías de reparación. Las células deficientes en BRCA1 y expuestas a inhibidores de PARP, como el olaparib, no podrán reparar eficientemente los errores en el ADN, aumentando las alteraciones cromosómicas y llevando a la muerte celular. En ensayos clínicos en pacientes con cáncer de mama, ovario o próstata, con tumores deficientes en BRCA1 o BRCA2, se observó una potente actividad antitumoral de este agente. En base a esto decidimos investigar el efecto del tratamiento con olaparib y su combinación con otros compuestos en células de PCa con distintos niveles de expresión de BRCA1.

# **MATERIALES Y** **MÉTODOS**

## **CAPITULO I**

# **LÍNEAS CELULARES, DROGAS, TRATAMIENTOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS.**

### 1.1. Cultivo de células

#### 1.1.1 Condiciones de crecimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares de PCa sensibles a andrógenos LNCaP (ATCC: CRL-1740) y las líneas insensibles a andrógenos PC3 (ATCC:CRL-1435), 22Rv1 (ATCC: CRL- 2505), C4-2 (derivada de LNCaP), C4-2B (derivada de C4-2) y sus clones derivados por transfección estable, se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen). La línea celular de riñón de embrión humano HEK293 (ATCC: CRL-1573) fue cultivada en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO). Todas las líneas fueron suplementadas con 10% suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,5 µg/ml de anfotericina) en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> 5%.

Las líneas celulares derivadas por transfección estable fueron crecidas en medio de cultivo suplementado con geneticina (G418 – Sigma Aldrich). Durante la generación de estas líneas y durante la semana siguiente luego de ser descongeladas, las células fueron suplementadas con una dosis de G418 de selección. Transcurrido ese período, las células se mantuvieron con una dosis de mantenimiento de G418. La generación de las líneas celulares estables LNCaP shRNA Scramble y LNCaP shRNA BRCA1 se detalla más adelante en esta sección (sección 1.4).

#### 1.1.2. Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares (PC3, PC3 estables, LNCaP, LNCaP estables, 22RV1, C4-2, HEK293) fueron crecidas en placas de Petri de 100 mm de diámetro con 5 ml de medio de cultivo. Los cultivos celulares fueron repicados cuando alcanzaron el 90% de confluencia, realizando dos lavados con 5 ml de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM pH = 7,4) y una incubación con 1 ml de tripsina (0,25% en PBS) durante 1-3 minutos en estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> 5%. El efecto de la tripsina se interrumpió por dilución con medio de cultivo.

Las líneas celulares fueron mantenidas entre los pasajes 20 y 50 para realizar los experimentos.

Las líneas celulares se mantuvieron en tubos de reserva en nitrógeno líquido generados a partir de aproximadamente  $3 \cdot 10^6$  células en un 1 ml de SFB suplementado con 7% de dimetilsulfóxido (DMSO). Cada vez que fue necesario los criotubos se descongelaron de manera rápida por incubación en baño a 37°C transfiriéndolas al medio de cultivo previo lavado para eliminar el DMSO.

### 1.2. Obtención y diluciones de drogas

En el presente trabajo se utilizaron las siguientes drogas: flavopiridol (Sanofi); análogos de la talidomida: GU 973, GU987, GU990, GU992, GU993, GU998, GU1029, GU1031 (sintetizados y gentilmente obsequiados por el Dr. Figg, NIH, USA), CPS49 (Celgene Corporation, NJ, USA); olaparib (Astrazeneca, UK) y paclitaxel (DOSA S.A., Buenos Aires, Argentina). Todas las drogas utilizadas fueron diluidas en DMSO, mientras que el paclitaxel fue diluido en etanol.

Las drogas fueron reconstituidas y alicuotadas en stocks de 100 mM, conservadas a -20°C. En el momento de utilizar las drogas, el stock fue diluido en 10 mM y luego en 100µM en el medio de cultivo correspondiente. A partir de esta concentración se prepararon las diluciones de trabajo. Para el control las células se incubaron con DMSO diluido en medio de cultivo (1:1000).

En el caso de paclitaxel, el stock (7 µM) fue conservado a -4°C y las diluciones de trabajo fueron realizadas a partir del stock en el medio de cultivo apropiado.

### 1.3. Obtención de plásmidos

#### 1.3.1. Plásmidos

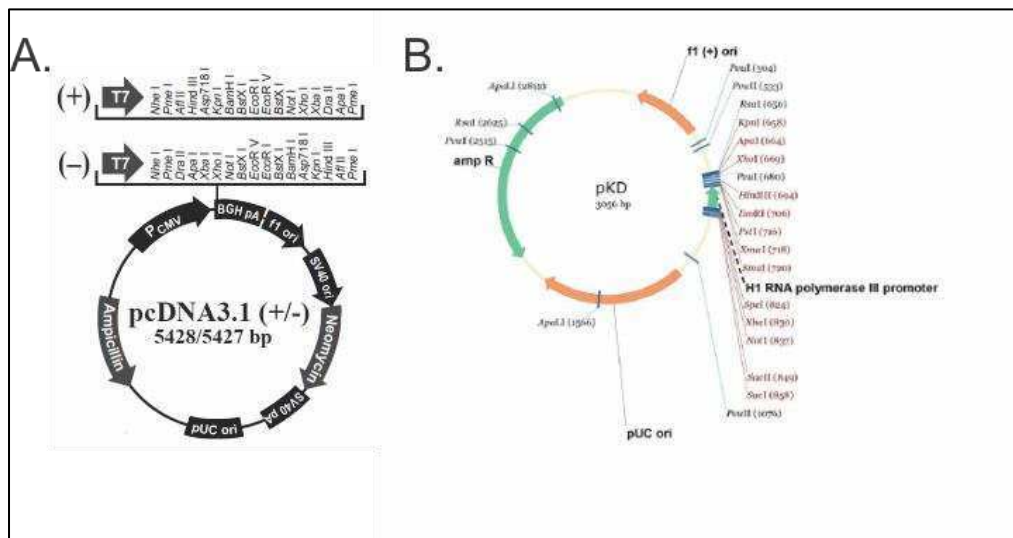
Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

➤ **pcDNA3** (Invitrogen): plásmido de expresión que contiene un promotor fuerte (pCMV) y un sitio de clonado con varios sitios de corte para enzimas de restricción como se indica en la Figura 13A.

➤ **pcDNA3-BRCA1 wt**: plásmido de expresión que contiene clonado el ADNc completo de BRCA1 wild type, bajo la regulación de un promotor fuerte (pCMV). Este plásmido fue cedido gentilmente por Dr. Kevin Gardner (NCI, NIH, Bethesda, USA)(Aprelikova et al., 1999).

➤ **shRNA scramble = pKD (Upstate)**: plásmido de expresión de siRNA en mamíferos. Este plásmido contiene una secuencia “scramble” (mezcla) en el sitio de clonado o la secuencia de un gen cuya expresión se quiere silenciar. Ver esquema en la Figura 13 B.

➤ **shRNA BRCA1 = pKD shBRCA1 (Upstate)**: plásmido que contiene una secuencia del gen BRCA1 en el sitio de clonado.



**Figura 13. A. Mapa del plásmido pcDNA 3.1:** Se observa el sitio de múltiple clonado; el promotor de citomegalovirus (pCMV); la resistencia para ampicilina (Ampicillin) y para neomicina (Neomycin); el origen de replicación para *E. coli* (pUC ori); y el origen de replicación para bacteriófagos (f1 ori). **B. Mapa del plásmido pKD** indicando el sitio de múltiple clonado; el promotor (H1 RNA polymerase III); la resistencia para ampicilina (Ampicillin); el origen de replicación para *E. coli* (pUC ori) y el origen de replicación para bacteriófagos (f1 ori).



## **CAPITULO II**

# **MÉTODOS PARA ANALIZAR EXPRESIÓN DE GENES, PROTEÍNAS Y ENSAYOS CELULARES**

## **2.1. Análisis de expresión génica a nivel de ARN mensajero**

### **2.1.1 Aislamiento de ARN**

Las células fueron crecidas en placas de Petri de 60 mm hasta una confluencia del 70%. Al día siguiente las células eran tratadas durante 24 h. con: flavopiridol: 2,5  $\mu$ M; CPS49: 2,5  $\mu$ M; combinación de flavopiridol y CPS49: 2,5  $\mu$ M de cada droga; pre-tratamiento con flavopiridol y luego combinación de flavopiridol y CPS49: 0,2  $\mu$ M de flavopiridol por 8 horas y luego 2,5  $\mu$ M de cada droga, o con DMSO como control. A las 24 horas, finalizado el tratamiento, las células eran cosechadas.

Para el aislamiento de RNA las células fueron lavadas 2 veces con 4 ml de PBS. Luego se agregó 500  $\mu$ l de Tri-Reagent (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina), y con la ayuda de una espátula las células fueron colectadas y se continuó con el protocolo de extracción.

Las soluciones homogeneizadas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló enérgicamente con *vortex* durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Se centrifugó a 12.000 rpm 4°C durante 15 minutos conservando la fase acuosa ya que esta contiene el ARN. El ARN se precipitó 250  $\mu$ l de isopropanol incubando a -20°C durante 30-40 minutos. Se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75 %. Se centrifugó a 7.500 rpm a 4°C durante 5 minutos y se removió el sobrenadante. Para eliminar las trazas remanentes de etanol, el pellet se secó a 50°C durante 3 minutos, se resuspendió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y se rehidrató incubando 10 minutos a 55-60°C. El ARN extraído se conservó a -70°.

La concentración y la pureza del ARN se midió en espectrofotómetro (Gene Quant Pro, Amersham Biosciences) midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y a 280 nm ( $A_{280}$ ). La concentración de ARN se calculó utilizando la fórmula:

$$[ARN] = 40 \times A_{260} \times \text{Factor de dilución} \times$$

Donde 40 es la constante de Lambert-Beer para una cuba de cuarzo de 1 cm de largo.

La pureza se calculó realizando el cociente entre  $A_{260}$  y  $A_{280}$ , siendo 2 el cociente que corresponde a una muestra de ácido nucleico que no contiene impurezas proteicas.

### 2.1.2 Obtención del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)

El ADNc (ADN copia) se sintetizó a partir del ARN total mediante transcripción reversa o retrotranscripción (RT) utilizando el kit RevertAid First Strand RT (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las concentraciones del ARN utilizadas para realizar la retrotranscripción fueron mayores a  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  con una pureza cercana a 1,9. Para realizar esta reacción se preparó la siguiente mezcla:

**Tabla 1. Protocolo para la retrotranscripción**

Reactivo	Volumen	Concentración final
ARN	2 $\mu\text{g}$ (volumen variable)	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Oligo dT 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
H2O DEPC	Cantidad necesaria	-
5 min a 65°C		
Buffer 5X	4 $\mu\text{l}$	1X
Inhibidores de RNAsa 20 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1U/ $\mu\text{l}$
dNTP 10mM	2 $\mu\text{l}$	0,5 mM
RevertAid RT 200 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	10 U/ $\mu\text{l}$
Volumen Final	20 $\mu\text{l}$	
60 min a 42°C		
5 min 70°C		

Se mezclaron el ARN con el Oligo dT y el agua libre de RNAsas y se desnaturalizaron las muestras a 65°C durante 5 minutos. Luego se le agregó la mezcla de reacción conteniendo el buffer de reacción, dNTPs, inhibidores de RNAsas y transcriptasa reversa, tal como se indica en la tabla y se incubó durante 60 minutos a 42°C. La reacción se inactivó a 70°C durante 5 minutos. El ADNc obtenido se utilizó en reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) o se conservó a -20°C.

<b>Gene Name</b>	<b>RefSeq NM#</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
SFN	NM_006142	5'CTGTCCAGTTCTCAGCCACA3'	5'CAGGCTACTTCTCCCCTCCT3'
CCNB2	NM_004701	5'TTCTGATGCCTTGCTCTGC3'	5'ATGCGTCCATTTATATCTCTTCC3'
MAD2L1	NM_002358	5'AATACGGACTCACCTTGCTTGTAAC TAC3'	5'TGCCATCTTTCCAGGACCTCACC 3'
Che1	NM_012138	5'TCAGCCTGTCCCAGAGAGTT3'	5'AGGAGCTGGTCTTCCGTTCT3'
E2F4	NM_001950	5'GGTGTGGGTGCAGCAGAGCA3'	5'CAGGCTGGTGCCTGATGGGG3'
BRCA2	NM_000059	5'AAGCATTGGAGGAATATCGTAGG3'	5'CAGGTTCAGAATTATAGGGTGGA G3'
DDB2	NM_000107	5'TCACTTCCAGCACCTCACAC3'	5'ACGTCGATCGTCTCAATTC3'
FEN	NM_004111	5'GGCAACCCCGAACCAAGC3'	5'GCTCATAGAGGCATCAATGGC3'
BLM	NM_000057	5'GAATGGTTAAGCAGCGATG3'	5'TCAATACATGGAACCTTTCTCAG3'
H3F3B	NM_005324	5'AAAGCCGCCAGGAAAAGC3'	5'CAGACCCACCAGGTACGC3'
BRCA1	NM_007294	5'TGAAATCAGTTTGGATTCTGC3'	5'CATGCAAGTTTGAAACAGAAC3'
SELL	NM_000655	5'GGGCAGTTTAATATGGGTCA3'	5'CATTCTCTGGGTTGGCATT3'
MMP9	NM_004994	5'AGACCTGGGCAGATTCCAAACC3'	5'GCAAAGGCGTCGTCAATCACC3'
ENG	NM_001114 753	5'GCCGTGCTGGGCATCACCTT3'	5'GCTCCCGCTTGCTGGGGGAA3'
VEGF	NM_001025 366	5'GCCTTGCCTTGCTGCTCTACC3'	5'GTGATGATTCTGCCCTCCTCCT C3'
E- Cadherin	NM_004360	5'AAGGTTACCCAGCACCTTGCA3'	5'GGCAGAGGGACACACCAGTGTA GTAA3'
B- Catenin	NM_001098 209	5-CATAACCTTTCCCATCATCGT-3'	5'-TGTGGAGAGTTGTAATGGCA-3'
Vimentin	NM_003380	5'CACTCCCTCTGGTTGATAC3'	5'GTGATGCTGAGAAGTTTCG3'
Fibronectin	NM_002026	5'GCTCATCCGTGGTTGTATCAGG3'	5'TGGTCTGCTTGTCAAAGTGTC3'
Slug	NM_003068	5'TCGGACCCACACATTACC3'	5'CAGATGAGCCCTCAGATTTG3'
Snail	NM_003068	5'CCTGCGTCTGCGAACCTG3'	5'GTTGGAGCGGTCAGCGAAGG3'
CCNT1	NM_001240	5'CTTAGCACAGACTTCTTACTTC3'	5'GTGGCGTCAACATACTCC3'
ELL	NM_006532	5'CAGCGTTTCCAGTGTTC3'	5'CATTGAAGTCGTTCTTGTAGC3'
CtBP1	NM_001012 614	5'TACAGCGAGCAGGCATCC3'	5'TGGTCCTTGTTGACACAGTTC3'
Actin B	NM_001101	5'AAGATCATTGCTCCTCCTGAGC3'	5'CATACTCCTGCTTGCTGATCCA3'

**Tabla 2. Secuencia de *primers* para amplificar ADNc por qPCR**

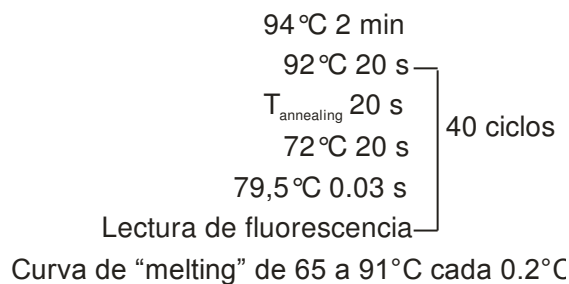
### 2.1.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

El ADNc se amplificó por qPCR utilizando el kit de Taq DNA Polimerasa (Fermentas). Dos microlitros de una dilución 1:20 del ADNc obtenidos en la RT, se amplificaron en una mezcla de reacción con buffer de reacción (1X); MgCl<sub>2</sub> (2 mM); oligos específicos

(0,4 µM); dNTPs (0,2 mM); 0,025 µl de SYBRgreen y 0,03 U/µl de Taq DNA polimerasa recombinante (Fermentas) en un volumen final de 25 µl.

Los *primers* utilizados se diseñaron con el programa Beacon Designer 5 y se testearon con el UCSC Genome Browser Home URL. Las secuencias de los *primers* específicos para cada uno de los genes analizados se detallan en la Tabla 4.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un aparato DNA Engine Opticon (MJ Research). El programa de amplificación se detalla a continuación (Figura 19):



**Figura 2.** Esquema del protocolo de ciclado para amplificar ADNc específico por qPCR.

Cada reacción de qPCR se realizó por duplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Opticon 3 trazando una recta en la parte exponencial de la curva de amplificación y obteniendo así los valores de CT. El cálculo de la inducción de la expresión de los genes analizados se basa en el método del  $\Delta\Delta CT$  (Current Protocols in Molecular Biology). Se estimó el promedio de los valores de CT para el gen incógnita y para el NRT (ARN que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retrotranscriptasa) de la siguiente manera:

$$\bar{C}_T = (C_{T1} + C_{T2})/2$$

La diferencia en los valores de  $C_T$  entre cada muestra y el No RT determina el delta- $C_T$  ( $\Delta C_T$ ). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta C_T = \bar{C}_T (\text{NRT}) - \bar{C}_T (\text{muestra})$$

Una vez normalizado y debido al exponente natural de qPCR, los valores son transformados a medidas relativas de veces de inducción ( $VI_a$ ) para una mejor comparación entre los experimentos:

$$VI_a = 2^{\Delta C_T}$$

Luego, se normalizaron nuevamente los niveles de ADNc de las muestras con su correspondiente control de carga ( $\beta$ -actina) de la siguiente manera:

$$VI_b = \frac{VI_a(\text{muestra})}{VI_a(\text{actina B})}$$

Donde  $VI_b$  representa las veces de inducción normalizada a  $\beta$ -actina. Finalmente, los datos se normalizaron respecto al control ( $VI_n$ ).

Para el cálculo de errores de cada medición se obtuvo el desvío estándar ( $ds$ ) de las mediciones del  $C_T$  de las muestras tratadas y no tratadas del gen y del control de  $\beta$ -actina de los datos obtenidos para cada tratamiento:

$$VI_b = \frac{\sum_{x=1}^n (C_{T_x} - \bar{C}_T)^2}{(n - 1)}$$

Donde  $n$  es el tamaño de la muestra.

Luego, el error se calculó como la raíz cuadrada de la suma de los errores de los  $C_T$  de las muestras, de los  $C_T$  de los NRT y de los  $C_T$  de  $\beta$ -actina como se describe en (Smith et al., 2004), aplicando la siguiente fórmula:

$$E = \left[ (ds/\bar{C}_T)_{NRT}^2 - (ds/\bar{C}_T)_{muestra}^2 - (ds/\bar{C}_T)_{actina}^2 \right]^{1/2}$$

y estos datos se multiplicaron por las veces de inducción finales.

#### **2.1.4 RT-qPCR Array**

A partir de los resultados obtenidos mediante RT-qPCR con cada uno de los genes analizados, los resultados fueron graficados en forma de *array*. Para ello primero se promedió el resultado de tres experimentos independientes y se calculó el valor  $p$  de

grupo. Se confeccionó el *array* utilizando tres colores; verde para los genes reprimidos, rojo para los inducidos y negro para aquellos que no presentaron cambios en sus niveles de expresión comparado con el grupo control.

Aquellos genes cuyos promedios estuvieran entre 0 y 0,85 veces de inducción, y fueran significativos respecto al control, fueron representados en color verde. Los promedios de los genes que presentaban inducción (o sea entre 1,5 y 5 veces de inducción) y fueran significativos, fueron representados por el color rojo. Y por último los promedios de los genes que se ubicaban entre 0,85 y 1,5 veces de inducción fueron simbolizados con el color negro.

### **2.2. Determinación de la viabilidad celular: MTS**

Para los ensayos de viabilidad celular, se sembraron 3000 células PC3; 5000 LNCaP; 6000 22Rv1; 8000 C4-2; 3000 C4-2B; 3000 MDA MB 231 o 6000 HEK-293 por pocillo en placa de 96, y se crecieron en 200  $\mu$ l de medio de cultivo (RPMI suplementado con antibióticos y SFB 10 %) en estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> 5 %. A las 24 horas se realizaron los tratamientos correspondientes (detallados para cada experimento en la sección *Resultados*) por triplicado durante 24 horas.

La viabilidad celular se determinó utilizando el reactivo comercial *Cell Titer 96 wells Aqueous non Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La solución comercial de MTS (2 ml) se mezcló con la solución comercial PMS (100  $\mu$ l) y se conservó en alícuotas a - 20°C protegido de la luz.

Al momento de cosechar las células se reemplazó el medio de cultivo de las placas de 96 pocillos con 40  $\mu$ l de medio de cultivo fresco y se agregaron 10  $\mu$ l del reactivo por pocillo. Como blanco de reacción se utilizaron 3 pocillos sin células con 40  $\mu$ l de medio de cultivo. Las placas se incubaron de 1-4 horas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5 %, en oscuridad y se midió la absorbancia a 490 nm en el luminómetro Glomax Multidetecion System (Promega).

La viabilidad celular para cada tratamiento se calculó como el porcentaje de la relación entre el promedio de la absorbancia de los triplicados y el promedio de la absorbancia de los triplicados de las muestras control.

Las concentraciones de drogas testeadas en este ensayo fueron:

- Flavopiridol: 0,2  $\mu\text{M}$  (pre-tratamiento con Fp); 0,625  $\mu\text{M}$ ; 1,25  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ .
- CPS49: 0,625  $\mu\text{M}$ ; 1,25  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ .
- Paclitaxel: 5 nM (pre-tratamiento con Ptx); 6,25 nM; 12,5nM; 25 nM; 50 nM.
- Olaparib: 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 20  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 30  $\mu\text{M}$ ; 35  $\mu\text{M}$ ; 40  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$ .
- Análogos de talidomida: 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 40  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$ .

También se evaluaron combinaciones de algunas de estas drogas que se encuentran indicadas en cada experimento de la sección *Resultados*.

### 2.3. Ensayo clonogénico de formación de focos

Las células fueron plaqueadas en una densidad de 500 células por placa de 6 cm. Luego de 24 horas fueron expuestas a distintas concentraciones de flavopiridol, CPS49, paclitaxel o sus combinaciones, durante 3 semanas. El medio de cultivo con cada tratamiento fue renovado cada 3 días. Al finalizar el tratamiento, las células fueron fijadas con metanol por 30 minutos, luego se lavaron y dejaron secar por 24 horas. Al día siguiente, se tiñeron con una solución de cristal violeta (0,1 % m/v en ácido fosfórico 200 mM pH = 6) por 5-10 minutos y luego se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada. Una vez que las placas estaban secas fueron fotografiadas utilizando el equipo Phosphorimager (Fuji Photo Film Co. Ltd., Cypress, CA).

Las concentraciones de drogas testeadas en este ensayo fueron:

- Flavopiridol: 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ .
- CPS49: 0,3  $\mu\text{M}$ ; 0,6 $\mu\text{M}$ .
- Paclitaxel: 0,3 nM; 0,6 nM.

También se evaluaron combinaciones de estas drogas que se encuentran indicadas en cada experimento de la sección *Resultados*.



#### **2.4. Ensayo migración celular por herida o “wound healing assay”**

Para medir la capacidad de migración celular de la línea celular PC3 luego de distintos tratamientos, se hizo un ensayo de “wound healing” (Petit y Thiery, 2000), en el que se mide la migración celular mediante la cicatrización *in vivo*.

Dicho ensayo se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una grieta o “herida”. Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta cerrar la “herida”.

Las células se cultivaron hasta una confluencia del 90% en una placa de 6 pocillos. Fueron expuestas a los distintos tratamientos durante 16 h y luego se realizó una grieta con un tip de p200 inclinándolo con un ángulo de 30°C aproximadamente, desde una punta del pocillo hasta la otra, atravesando el pocillo por la mitad. Una vez realizada la grieta, se lavaron las células con mucho cuidado dos veces con PBS de modo de descartar las células que se desprendieron de la zona de la grieta. Se agregó medio de cultivo completo. Los tratamientos realizados fueron:

- Flavopiridol: 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M.
- CPS49: 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M.
- Combinación de flavopiridol y CPS49: 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M de cada droga.

Se realizaron triplicados por cada tratamiento. Se tomaron fotografías al tiempo 0, 6 y 10 horas con una cámara digital Canon A520 acoplada sobre el microscopio invertido del cuarto de cultivo, y se midió el porcentaje del área de “herida” que quedó sin cerrar en cada pocillo. Para ello se utilizó el programa “Image J”. Con este programa se puede determinar el área bajo una curva. De esta forma se determinó como el 100% el área que ocupaba la herida en el tiempo 0 horas. Luego se calculó el área de la herida descubierta en los distintos tiempos evaluados y se determinó el porcentaje del área de la herida descubierta en los distintos tiempos respecto del porcentaje del área inicial de la herida a tiempo 0 ( $\% \text{ herida abierta} = \frac{\text{área de la herida en tiempo}_0}{\text{área de la herida en tiempo}_n} * 100$ ). Para graficar los resultados, se calculó el porcentaje del área de la herida cerrada en función de las horas. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes.

### 2.5. Determinación del contenido de ADN por citometría de flujo.

Para determinar el porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular por citometría de flujo,  $5 \times 10^5$  de células PC3 fueron sembradas en placas de 10 cm de diámetro y se expusieron a distintos tratamientos durante 24 horas:

- Flavopiridol: 2,5  $\mu$ M.
- CPS49: 2,5  $\mu$ M.
- Combinación de flavopiridol y CPS49: 2,5  $\mu$ M de cada droga.
- Pre-tratamiento con flavopiridol y luego combinación de flavopiridol y CPS49: 0,2  $\mu$ M de flavopiridol por 8 horas y luego 2,5  $\mu$ M de cada droga.

Al finalizar los tratamientos, las células fueron cosechadas por tripsinización, lavadas con 2 ml de PBS frío y resuspendidas en 1,5 ml de PBS frío. Luego se las fijó en etanol 70 % durante toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$ . Luego las células fueron lavadas con 5 ml de PBS y se realizó la marcación con yoduro de propidio resuspendiendo el pellet celular en 500  $\mu$ l de PBS con 50  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio y 120  $\mu$ g/ml de RNAsa A e incubando 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . La distribución del ciclo celular se analizó en el citómetro de flujo BD FACS ARIA II.

### 2.6. Determinación de apoptosis por citometría de flujo

Las células fueron plaqueadas en placas de 100 cm de diámetro y se realizaron los tratamientos indicados en la sección *Resultados*. Al finalizar, se cosecharon las células por tripsinización y se resuspendieron en medio de cultivo. A esta suspensión de células se le agregó el medio de cultivo obtenido de la placa (ya que este podría tener células muertas). Se realizó un lavado con 5 ml de PBS y otro con 1 ml de Buffer de Binding (BD Pharmingen). Se calculó la concentración celular de cada tratamiento mediante conteo de células con cámara de Neubauer. Se resuspendieron  $10^5$  células en 100  $\mu$ l de Buffer de Binding. Para la marcación se agregaron 5  $\mu$ l de Annexin V-FICT (BD Pharmingen) y se incubó por 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se agregaron 5  $\mu$ l de yoduro de propidio (50  $\mu$ g/ml, BD Pharmingen) y se incubó 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Por último se agregaron 300  $\mu$ l de Buffer de Binding y las células

se analizaron por citometría de flujo (FACS) dentro de la primer hora luego de terminada la marcación en el citómetro BD FACS ARIA II.

Se realizaron los controles respectivos para verificar si alguna de las drogas utilizadas interfería con el yoduro de propidio o con anexina, así como se analizó la autofluorescencia de cada tratamiento.

- Flavopiridol: 2,5  $\mu\text{M}$ .
- CPS49: 2,5  $\mu\text{M}$ .
- Combinación de flavopiridol y CPS49: 2,5  $\mu\text{M}$  de cada droga.
- Pre-tratamiento con flavopiridol y luego combinación de flavopiridol y CPS49: 0,2  $\mu\text{M}$  de flavopiridol por 8 horas y luego 2,5  $\mu\text{M}$  de cada droga.

**CAPITULO III**

**ESTUDIOS *IN VIVO***

### **3. Experimentos con xenotransplantes.**

#### **3.1 Animales utilizados**

Se utilizaron ratones atímicos *nude* de 6 semanas que pesaban entre 20 y 25 gramos. Estos animales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad de La Plata y se mantuvieron en condiciones libre de patógenos de acuerdo a las normas de cuidado de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo aprobado por CICUAL – FCEN, UBA).

#### **3.2 Generación de xenotransplantes**

Los xenotransplantes se generaron a partir de la inoculación de  $5 \times 10^6$  células PC3 en el flanco izquierdo del animal por vía subcutánea. Las células fueron crecidas en placas de  $10 \text{ mm}^3$  como se detalla previamente hasta una confluencia del 90 %. Al momento de cosechar se lavaron con PBS dos veces y se resuspendieron las células de todas las placas en un mismo tubo. Luego se procedió a contabilizar la concentración de células cosechadas utilizando la cámara de Neubauer. Se alicuotaron las  $5 \times 10^6$  células en Solución Fisiológica. Se inmovilizaron los animales, se limpió con Iodo Povidona el área a inyectar y utilizando una aguja 30G se inocularon las células subcutáneamente en el flanco izquierdo de los animales.

Se midió el tamaño tumoral de los xenotransplantes tres veces por semana, utilizando un calibre digital. El volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula:  $0,523 \times \text{ancho}^2 \times \text{largo}$ , donde el ancho representa la dimensión de menor tamaño del tumor.

Al día 14 post-inoculación, cuando el volumen tumoral alcanzaba entre  $70\text{-}100 \text{ mm}^3$ , los animales se distribuyeron aleatoriamente en distintos grupos (6 ratones/grupo) y se administraron las distintas drogas intraperitonealmente (i.p.). Las dosis elegidas para los tratamientos fueron preparadas en solución fisiológica, en un volumen final de  $200 \mu\text{l}$ .

En estos experimentos se evaluaron dos estrategias de terapia. La primera consiste en la administración de una droga o de la combinación de dos drogas durante 2 semanas. La siguiente consiste en una semana de pre-tratamiento con muy bajas dosis de una droga, y luego la administración de una combinación de drogas durante dos semanas.

En el primer experimento se evaluaron los efectos de cada droga como monodroga. Para ello se dividieron los animales en cuatro grupos: i) grupo flavopiridol: se inyectaron 6mg/Kg/día, 4 veces por semana durante 2 semanas; ii) grupo CPS49: se inyectaron 6mg/Kg/día, 4 veces por semana durante 2 semanas; iii) grupo paclitaxel: se inyectaron 12mg/Kg/día, 3 veces por semana durante 2 semanas, iv) grupo DMSO: se inyectó 1% DMSO en solución fisiológica, 4 veces por semana durante 2 semanas.

En el segundo experimento se evaluaron los efectos de la combinación de las drogas como multidroga. Se dividieron los animales en 4 grupos: i) grupo co-tratamiento flavopiridol/CPS49: 4 inyecciones de DMSO 1% durante la primer semana, y 4 inyecciones de flavopiridol (6mg/kg/días) y CPS49 (6mg/kg/días) durante las 2 semanas siguientes; ii) grupo pre-tratamiento flavopiridol, co-tratamiento flavopiridol/CPS49: 4 inyecciones de flavopiridol (2mg/Kg/día) durante la 1<sup>o</sup> semana, y 4 inyecciones de flavopiridol (6mg/kg/días) y CPS49 (6mg/kg/días) durante las 2 semanas siguientes; iii) co-tratamiento de paclitaxel/CPS49: 3 inyecciones de paclitaxel (12mg/Kg/día) y CPS49 (6mg/kg/día) durante 2 semanas; iv) grupo DMSO: se inyectó 1% DMSO en solución fisiológica, 4 veces por semana durante 3 semanas.

Los tratamientos de aquellos animales en los que se realizaba una semana de pre-tratamiento con el vehículo o con flavopiridol que pertenecían al grupo i) o ii) del segundo experimento, comenzaban una semana antes de lo estimado para que el tumor alcanzara un volumen entre 70-100 mm<sup>3</sup>. De esta forma todos los tratamientos realizados en los dos experimentos se alineaban en tiempo y volumen tumoral al comenzar los tratamientos o co- tratamientos con las drogas, quedando los pre-tratamientos desfasados una semana antes de comenzar con el resto de los tratamientos.

Los animales se sacrificaron 24 horas luego de la última inyección y se extrajeron porciones de los tumores de entre 2 y 4 mm de diámetro para aislar el ARN tumoral, proteínas y hacer tinciones histológicas. Las secciones para extracción de ARN se sumergieron en 500µl de Tri-Reagent (Genbiotech), se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. Las secciones destinadas al análisis de proteínas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C. También se seccionaron parte de los pulmones, del hígado y de los riñones para hacer un análisis

de toxicidad. A las secciones del tumor destinadas a tinciones histológicas y a los órganos reservados para evaluar toxicidad se los embebieron en formalina tamponada 10% PH 7,2 (100 ml de formaldehído al 34-40%, 4 g fosfato sódico monobásico monohidrato, 6,5 g de fosfato sódico dibásico anhidro y 900 ml de agua destilada).

### **3.3 Análisis de expresión génica a nivel de ARN mensajero**

La porción del tumor destinada para el análisis de la expresión de ARN fue conservada en Tri-Reagent (Genbiotech) a -80°C. Al momento de realizar el aislamiento del ARN las muestras fueron descongeladas en hielo y se agregó Tri-Reagent hasta llegar a 1 ml de volumen final. Luego las muestras fueron homogeneizadas utilizando el Ultraturax 2 veces durante 15 segundos. Y finalmente trasvasadas a un tubo y conservadas a -80°C. Luego se continuó con el protocolo de extracción como se detalla en la sección Materiales y Métodos 2.1.

### **3.4 Análisis histológico**

Los tumores fijados en para-formaldehído 4% fueron procesados para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5  $\mu$ m de espesor. Por un lado se colorearon con la técnica de hematoxilina-eosina y por otro se realizó la técnica histológica tricrómica de Masson. Estos ensayos fueron llevados adelante y se realizaron como parte de una colaboración con el Dr. Roberto P. Meiss, Jefe de la División Patología Experimental de la Academia Nacional de Medicina (Buenos Aires, Argentina).

### **3.5. Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (SD) de "n" experimentos independientes. Para determinar la significancia estadística se realizó un análisis de ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey, o de ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni, utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.00, considerando significativos aquellos resultados donde el valor P fuera menor a 0,05. Para los experimentos *in vivo*, dos experimentos independientes se realizaron con 6 ratones por grupo de tratamiento contra las drogas. La comparación de dichos experimentos realizó mediante un análisis de ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett's, con P <0,05 como criterio para la significancia estadística.

# **RESULTADOS**



## **CAPÍTULO I**

# **ESTUDIOS *IN VITRO* CON ANÁLOGOS DE TALIDOMIDA**

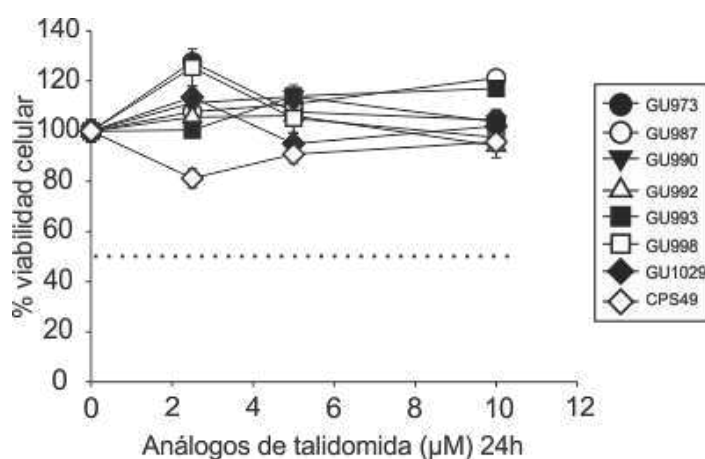
La evolución de la talidomida como un tratamiento efectivo para varios tipos de tumores (Shortt et al., 2013) ha impulsado el desarrollo de nuevos compuestos con mayores efectos antiangiogénicos y antitumorales, y con reducción de los efectos adversos en los pacientes (Aragon-Ching et al., 2007).

El Dr. William Figg (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA), colaborador de nuestro proyecto, había generado un análogo de talidomida: el CPS49 (Aragon-Ching et al., 2007; Ng et al., 2004). Previamente a este trabajo de tesis, había sido reportado que este compuesto mata en forma selectiva células de leucemia a través del aumento de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y modulando múltiples vías transcripcionales (Ge et al., 2006). Asimismo, el Dr. Figg desarrolló y nos envió 7 nuevos análogos estructurales de talidomida: GU973, GU987, GU990, GU992, GU993, GU998 y GU1029.

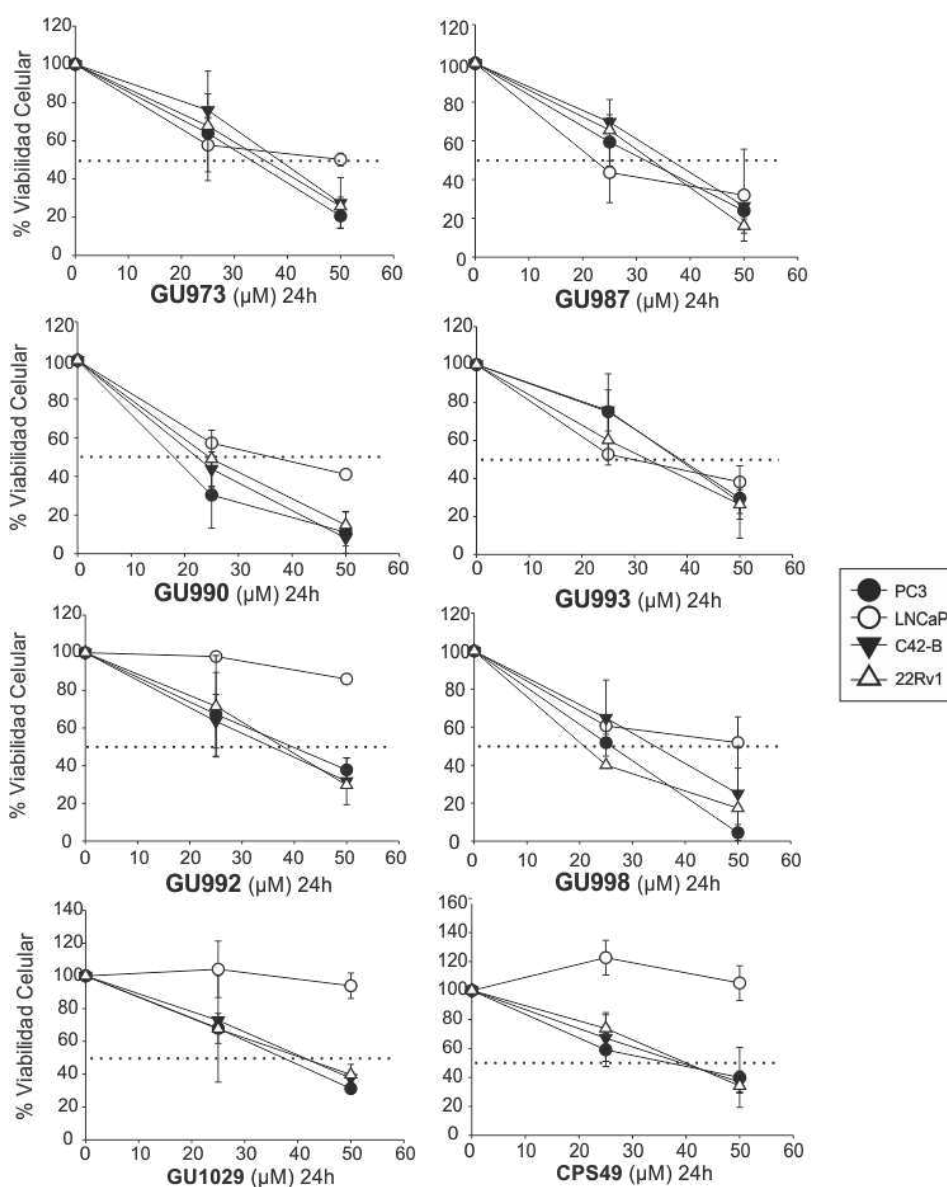
En este primer capítulo presentaremos nuestros estudios *in vitro* utilizando estos análogos de talidomida.

### 1.1. Los análogos de talidomida en altas concentraciones disminuyen la viabilidad de líneas de PCa.

Con el propósito de estudiar los efectos de estos compuestos en el PCa, en primer lugar expusimos a la línea celular PC3 a concentraciones bajas de estas drogas: 2,5; 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Como se observa en la Figura 14, ninguno de los análogos fue citotóxico para las líneas celulares de PCa en las concentraciones evaluadas.



**Figura 14. Citotoxicidad de bajas concentraciones de los análogos de talidomida en células de PC3.** La línea PC3 se expuso durante 24 horas a distintas concentraciones (0-10  $\mu\text{M}$ ) de los análogos de talidomida: GU973, GU987, GU990, GU992, GU993, GU998, GU1029 y CPS49. Luego de los tratamientos se midió la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. La figura muestra el promedio de dos experimentos independientes y su desvío estándar.



**Figura 15. Citotoxicidad de los análogos de talidomida (10-50  $\mu$ M) en células de PCa y células no tumorales.** Las líneas celulares de PCa sensibles (LNCaP) o insensibles a andrógenos (PC3, 22Rv1, C4-2B) se expusieron durante 24 horas a distintas concentraciones de los análogos de talidomida: GU973, GU987, GU990, GU992, GU993, GU998, GU1029 y CPS49. Luego de los tratamientos se midió la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. La figura muestra el promedio de tres experimentos y su desvío estándar.

En base a este resultado, decidimos aumentar las dosis de las drogas, y realizamos un nuevo ensayo de MTS en un panel más amplio de líneas tumorales de próstata: PC3, LNCaP, 22Rv1 y C4-2B. Encontramos que sólo algunos compuestos disminuyeron la viabilidad de las líneas celulares a un 50 % o menos, en la dosis de 25  $\mu$ M: GU987 fue

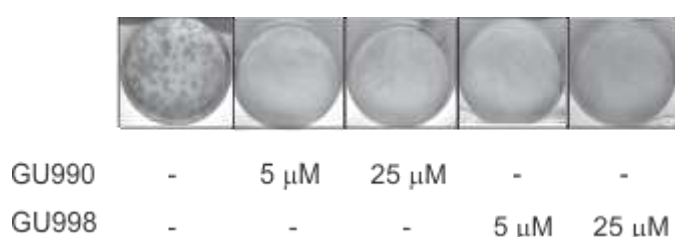
citotóxico para la línea LNCaP; GU990 fue citotóxico para PC3 y C4-2B; GU998 lo fue para PC3 y 22Rv1.

También observamos que todas las líneas de PCa evaluadas fueron sensibles a altas concentraciones (50  $\mu$ M) de los análogos, pero la línea LNCaP resultó ser resistente a los compuestos GU992, GU1029 y CPS49 (Figura 15). Esto podría ser un hallazgo interesante ya que en principio en este trabajo de tesis estábamos buscando compuestos altamente tóxicos para células insensibles a andrógenos.

### 1.2. Los análogos de talidomida GU990 y GU998 disminuyen la capacidad clonogénica de la línea celular PC3

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, decidimos estudiar la capacidad clonogénica *in vitro* de las células PC3 bajo el tratamiento de los dos análogos de talidomida que habían mostrado ser más citotóxicos: GU990 y GU998. Luego de sembrar 500 células PC3 por placa de 60 mm, expusimos a las células a dos concentraciones distintas de los compuestos (5 y 25  $\mu$ M) durante 3 semanas y evaluamos la capacidad de formar colonias aisladas bajo estos tratamientos.

El tratamiento con ambas dosis de los dos análogos aquí estudiados impidió la formación de colonias aisladas en células PC3 (Figura 16).



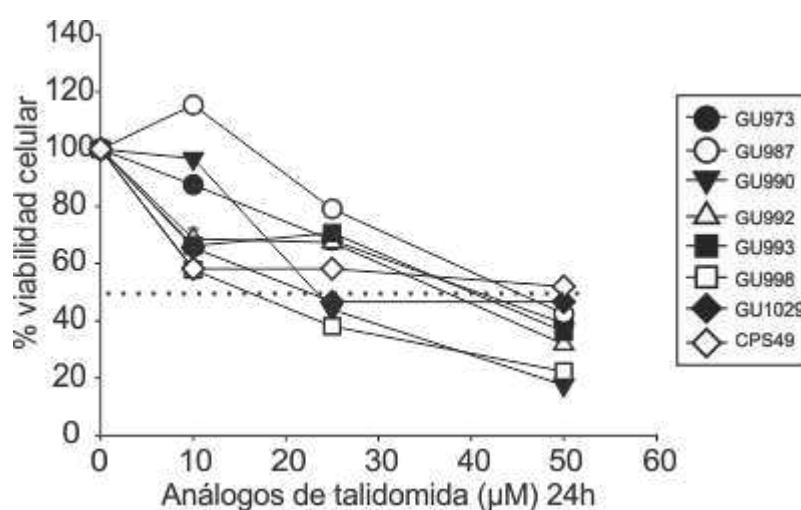
**Figura 16. Crecimiento en colonias de células PC3 tratadas con GU990 o GU998.** Ensayo clonogénico a partir de células PC3 tratadas durante 3 semanas con dos concentraciones distintas de GU990 o GU998. Las imágenes corresponden a un experimento representativo de dos réplicas independientes.

### 1.3. La línea no tumoral HEK293 es resistente a altas concentraciones de CPS49.

Con el propósito de estudiar la selectividad de los análogos para las líneas celulares de PCa, decidimos analizar los efectos de estos compuestos en una línea no tumoral. Para ello expusimos a la línea HEK293 a distintas concentraciones de los análogos durante 24 horas y realizamos un ensayo de viabilidad celular (MTS).

Como podemos observar en la Figura 17, la mayoría de los análogos fue citotóxico en esta línea celular cuando se evaluó la dosis más elevada (50  $\mu\text{M}$ ). Además, los análogos GU990, GU998 y GU1029 disminuyeron la viabilidad celular de la línea HEK293 a niveles menores del 50% cuando se utilizó una dosis de 25  $\mu\text{M}$ .

Interesantemente, la línea HEK293 resultó ser resistente a las dosis de 25 y 50  $\mu\text{M}$  del compuesto CPS49 (Figura 17). Este hallazgo fue muy promisorio ya que nuestro objetivo era utilizar un compuesto que fuera citotóxico para las líneas tumorales de PCa sin producir efectos sobre las líneas no tumorales.



**Figura 17. Citotoxicidad de los análogos de talidomida en células no tumorales HEK293.** La línea HEK293 fue expuesta durante 24 horas a distintas concentraciones (10-50 $\mu\text{M}$ ) de los análogos de talidomida: GU973, GU987, GU990, GU992, GU993, GU998, GU1029 y CPS49. Luego de los tratamientos se midió la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. La figura muestra el promedio de dos experimentos independientes y su desvío estándar.

**A partir de estos resultados podemos concluir que los análogos GU990, GU998 y CPS49 son buenos candidatos antitumorales para combinar con otros compuestos y estudiar sus efectos en ensayos pre-clínicos de PCa. Sin embargo en las dosis estudiadas los análogos GU990 y GU998 también disminuyen la viabilidad de las células no tumorales. Es por ello que especulamos que estos agentes podrían causar efectos citotóxicos no deseados en los pacientes. Por lo tanto, considerando que las células no tumorales fueron resistentes a dosis altas de CPS49 y teniendo en cuenta los estudios previos de nuestro laboratorio en células de leucemia**

*(Ge et al., 2006), creemos que el CPS49 sería un candidato más eficaz que potencialmente se podría utilizar en el tratamiento del PCa. Es por ello que decidimos utilizar este compuesto en estudios posteriores.*

## **CAPITULO II**

# **ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA COMBINACIÓN DEL ANÁLOGO DE TALIDOMIDA CPS49 CON FLAVOPIRIDOL O PACLITAXEL**

Con el objetivo de combinar el CPS49 con otras drogas que aumente su citotoxicidad, en esta parte del trabajo estudiamos los efectos de dos agentes antitumorales: flavopiridol y paclitaxel en un panel de líneas celulares de PCa. Asimismo, volvimos a evaluar la citotoxicidad del CPS49 en estas líneas celulares.

Los antecedentes previos encontrados en la bibliografía demuestran que el flavopiridol es un agente citotóxico para las células tumorales prostáticas (Drees et al., 1997) y que la dosis inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de paclitaxel en células PC3 es de 5 nM (Takeda et al., 2007).

### **2.1. Dosis bajas de flavopiridol o paclitaxel son citotóxicas para las líneas celulares de PCa.**

Nuestro primer abordaje para estudiar la citotoxicidad de las drogas consistió en exponer a las líneas de PCa a bajas concentraciones de cada agente durante 24 horas y realizar un ensayo de viabilidad celular (MTS). Para ello utilizamos la línea sensible a andrógenos LNCaP, las insensibles a andrógenos PC3, C4-2 y 22Rv1, y la línea celular no tumoral de riñón de embrión humano HEK293 (Figura 18A).

Para realizar el análisis de los resultados del ensayo de viabilidad definimos tres tipos de sensibilidad a los agentes testeados: **sensibilidad alta** (porcentaje de viabilidad celular menor a 50); **sensibilidad moderada** (porcentaje de viabilidad celular entre 50 y 80) e **insensibles** (porcentaje de viabilidad celular mayor a 80).

Como se observa en la Figura 18A, la línea celular 22Rv1 presentó sensibilidad alta y las líneas PC3, C4-2 y LNCaP presentaron sensibilidad moderada a 2,5 y 5 $\mu$ M al flavopiridol. En el caso del CPS49 encontramos que las líneas celulares ensayadas fueron resistentes a estas concentraciones de droga (0,675 a 5  $\mu$ M). El paclitaxel, quimioterapéutico que actualmente se utiliza para el tratamiento del PCa avanzado, demostró ser selectivo para las líneas celulares de PCa. La línea PC3 fue altamente sensible a este agente en todas las concentraciones ensayadas. Las líneas LNCaP y 22Rv1 fueron altamente sensibles a 12,5 nM y 50 nM de paclitaxel, respectivamente. La línea celular C4-2 no fue utilizada en los experimentos con paclitaxel.



En los tratamientos realizados en la línea celular no tumoral HEK 293, observamos que ninguno de los tres compuestos afectó la viabilidad de esta línea. Esto implicaría una cierta selectividad de las drogas a las líneas celulares de PCa. Este resultado es interesante ya que se describió previamente que las células normales PBMCs también son resistentes al flavopiridol y CPS49 en estas dosis (Ge et al., 2008).

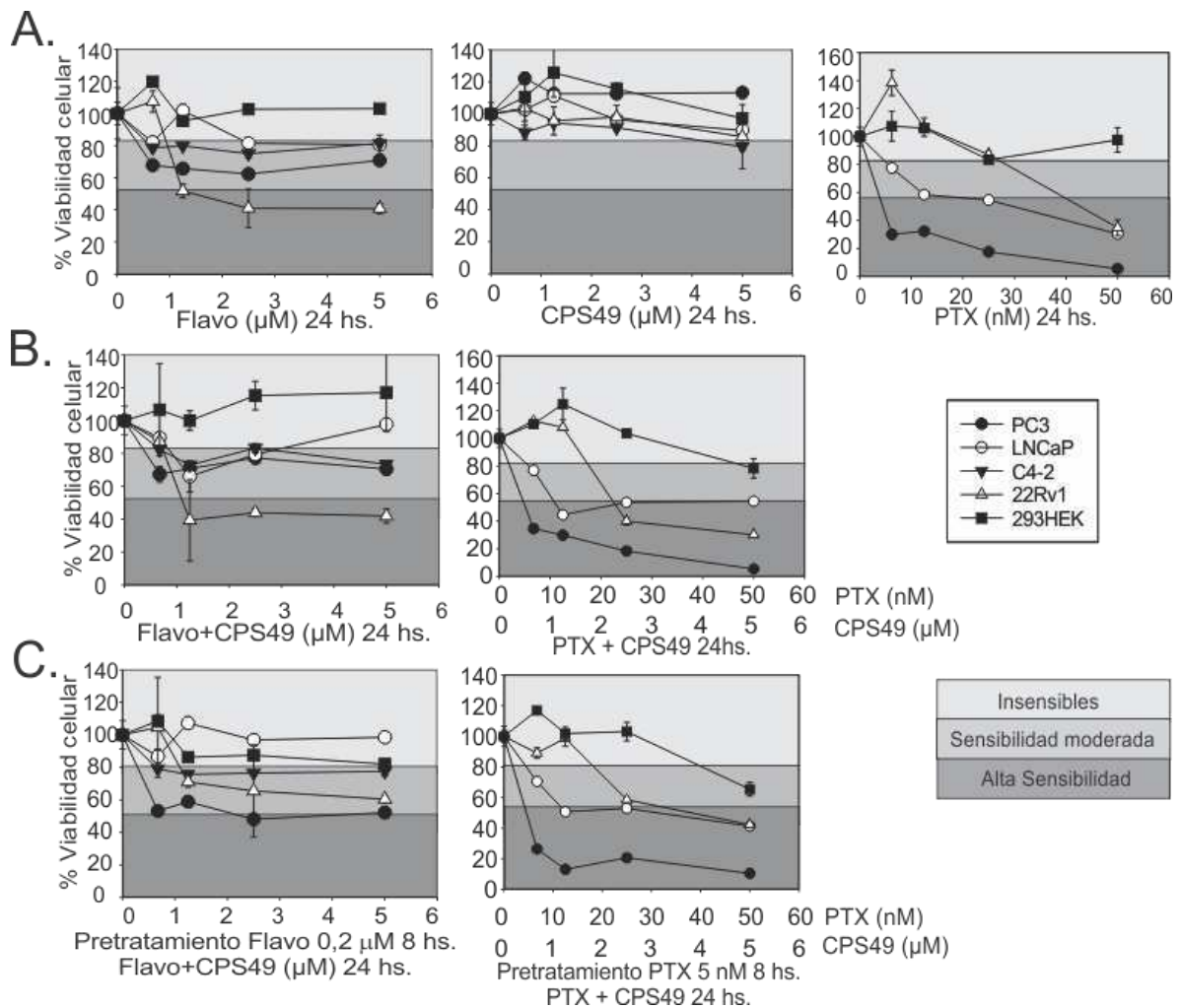
En resumen, el flavopiridol y el paclitaxel en bajas concentraciones son agentes citotóxicos y selectivos para las líneas celulares de PCa. El CPS49 no afecta la viabilidad en las dosis ensayadas.

## **2.2. La combinación de CPS49 con flavopiridol o paclitaxel disminuyen la viabilidad celular de las líneas celulares de PCa.**

En un trabajo previo demostramos que la combinación del CPS49 y flavopiridol es más citotóxico para las células de leucemia que cada droga utilizada como único agente (Ge et al., 2008). Debido a que tanto el flavopiridol como la talidomida son agentes antitumorales efectivos que generan en los pacientes efectos secundarios no deseables (Barlogie et al., 2001)(Figg et al., 2001) decidimos estudiar si la combinación del flavopiridol con el CPS49 en bajas concentraciones podrían mejorar la respuesta de cada compuesto por separado para el tratamiento del PCa, probablemente disminuyendo los efectos no deseados en los pacientes.

Para comenzar este estudio, primero analizamos el efecto de la combinación de estas drogas sobre la viabilidad celular de las líneas de PCa y HEK 293. En este ensayo, expusimos a las células durante 24 horas con distintas combinaciones de flavopiridol y CPS49 en una relación 1:1.

Como se observa en la Figura 18B, las líneas LNCaP y HEK 293 fueron resistentes a esta combinación, mientras que el resto de las líneas de PCa fueron entre moderada y altamente sensibles, siendo la línea 22Rv1 la de mayor respuesta citotóxica a la combinación.



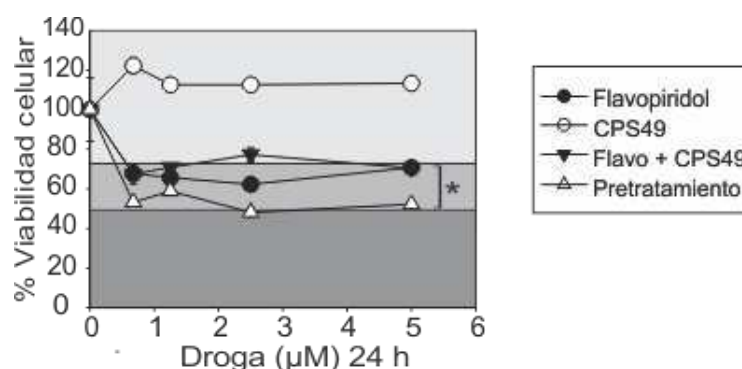
**Figura 18. Citotoxicidad de las células de PCa y no tumorales expuestas al tratamiento con flavopiridol, CPS49 y paclitaxel.** Las líneas celulares de PCa sensibles (LNCaP) o insensibles a andrógenos (PC3, 22Rv1, C4-2) y la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) se expusieron durante 24 horas a distintas concentraciones de: **A)** flavopiridol, CPS49 o paclitaxel; **B)** combinaciones de CPS49 con flavopiridol o paclitaxel; **C)** un pretratamiento en dosis subcitotóxicas de flavopiridol o paclitaxel, durante 8 horas y luego un tratamiento con CPS49 y flavopiridol o CPS49 y paclitaxel, respectivamente. Luego de los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. La figura muestra el promedio de tres experimentos independientes y su desvío estándar.

Luego decidimos estudiar el efecto de combinar CPS49 con paclitaxel sobre la viabilidad celular. Como se muestra en la Figura 18B, todas las líneas de PCa resultaron ser

altamente sensibles a la combinación, mientras que la línea no tumoral mostró moderada sensibilidad únicamente en la concentración más alta ensayada.

En ambos casos, la combinación de CPS49 con flavopiridol o paclitaxel no mejoró la citotoxicidad observada con cada droga por separado.

Previamente reportamos que un tratamiento inicial con concentraciones subcitotóxicas de flavopiridol y luego el cotratamiento con flavopiridol y CPS49 en células leucémicas sensibiliza a las células causando mayor muerte celular que la observada con el cotratamiento solamente (Ge et al., 2008). Para estudiar si esta nueva estrategia realizada sobre las células de leucemia producía efectos similares en las células de PCa, estudiamos el efecto en la viabilidad celular de la combinación de flavopiridol y CPS49 durante 24 horas, realizando previamente un tratamiento con concentraciones subcitotóxicas de flavopiridol (0,2  $\mu\text{M}$ ) durante 8 horas (Figura 18C).



**Figura 19. Citotoxicidad del tratamiento de flavopiridol y CPS49 en células PC3.** La línea celular PC3 se expuso durante 24 horas a distintas concentraciones de: flavopiridol, CPS49 o sus combinaciones. Luego se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. La figura muestra el promedio de tres experimentos independientes y su desvío estándar. \* $p < 0,05$

Las líneas celulares 22Rv1, C4-2 y PC3 mostraron sensibilidad moderada a esta estrategia de tratamiento, mientras que las líneas LNCaP y HEK293 fueron resistentes. Es interesante aclarar que en el caso de la línea PC3, la estrategia del pretratamiento de flavopiridol y luego el cotratamiento de flavopiridol y CPS49, fue significativamente más citotóxica que el cotratamiento de flavopiridol y CPS49 o incluso de flavopiridol solo, en las concentraciones de 2,5 y 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 19).

Del mismo modo, realizamos un pretratamiento con bajas dosis de paclitaxel durante 8 horas y luego tratamos a las células con la combinación de CPS49 y paclitaxel (Figura 18C). No encontramos diferencias en la viabilidad celular utilizando esta estrategia comparando la respuesta obtenida al tratar las células con paclitaxel como único agente.

***En conclusión, los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que la combinación de CPS49 y flavopiridol, luego de la sensibilización con bajas dosis de flavopiridol, fue la estrategia más citotóxica testada para la línea celular PC3 entre los tratamientos realizados con estas drogas. Es por ello que elegimos a esta línea celular para continuar los estudios in vitro e in vivo. Además, esta estrategia es selectiva para líneas celulares de PCa ya que las líneas celulares no tumorales (HEK 293 y previamente PBMCs) fueron resistentes al tratamiento.***

***El tratamiento con paclitaxel, uno de los quimioterapéuticos actualmente utilizado en la terapia del PCa, fue altamente citotóxico para PC3. Sin embargo, la combinación de este compuesto con CPS49 en las dosis bajas testadas no mejoró la respuesta del paclitaxel como único agente.***

### **2.3. La combinación del CPS49 con flavopiridol o paclitaxel inhiben la formación de colonias en la línea PC3**

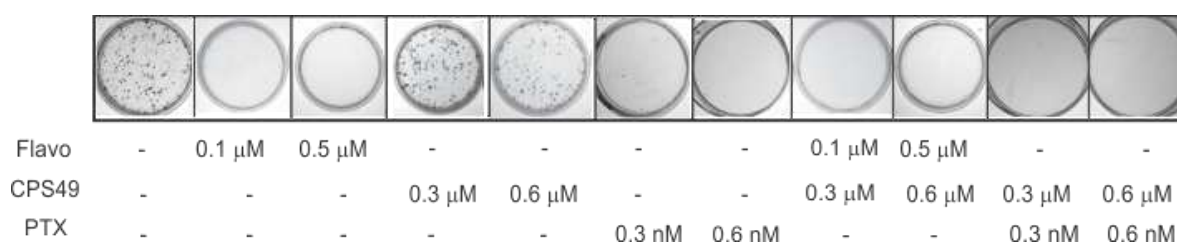
Con el objetivo de estudiar el efecto de las drogas y sus combinaciones sobre la proliferación celular, evaluamos el efecto de estos tratamientos en la capacidad clonogénica *in vitro* de las células PC3.

Para ello sembramos 500 células PC3 por placa de 60 mm y expusimos a las células a concentraciones subcitotóxicas de los distintos tratamientos durante 3 semanas. Al cabo de este período las placas se tiñeron con cristal violeta y evaluamos la cantidad de colonias aisladas.

El tratamiento con flavopiridol, paclitaxel y sus combinaciones con CPS49 impidieron la formación de colonias de PC3 (Figura 20). El tratamiento con CPS49 no alteró en forma significativa el número de colonias ya que el promedio de colonias contabilizadas en las

placas tratadas con el vehículo fue de 102 y en aquellas tratadas con CPS49 fue de 94 colonias.

***Podemos concluir entonces que el CPS49 no afecta la proliferación celular, mientras que el tratamiento con flavopiridol o paclitaxel inhibe la formación de focos, en las condiciones y concentraciones estudiadas.***



***Figura 20. Ensayo clonogénico de células PC3 tratadas con flavopiridol, paclitaxel, CPS49 o sus combinaciones.*** Las células PC3 fueron tratadas durante tres semanas con distintas concentraciones de flavopiridol, paclitaxel o CPS49, o con las combinaciones de CPS49 con flavopiridol o paclitaxel. Al cabo de ese tiempo las placas se lavaron y tiñeron con cristal violeta. Las fotos corresponden a un experimento representativo de dos réplicas independientes.

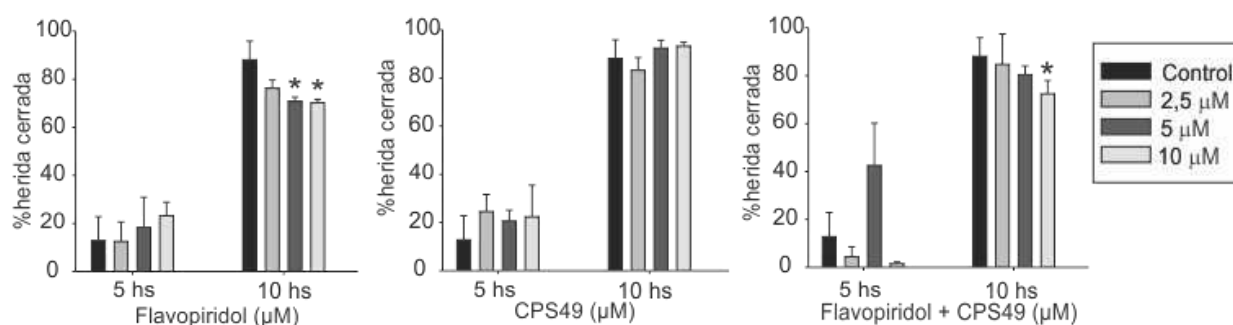
Para determinar si la eliminación del desarrollo de colonias era debida a las drogas o al efecto generado por el tiempo prolongado de exposición a los agentes, repetimos este ensayo, pero exponiendo las células durante 24 h a los distintos tratamientos, y luego agregando medio fresco hasta el final del ensayo. Utilizando este cambio de estrategia metodológica se obtuvieron resultados similares. En conclusión, la disminución de la proliferación de la línea celular PC3 causada por flavopiridol o paclitaxel no fue potenciada por la combinación con CPS49.

#### **2.4. El tratamiento con flavopiridol disminuye la capacidad migratoria de las células PC3**

Para evaluar la alteración de la capacidad migratoria de las células PC3 tratadas con las distintas drogas o su combinación, utilizamos un ensayo de migración celular basado en la técnica de la herida como se describió en materiales y métodos. Las células fueron

expuestas durante 16 horas a distintas concentraciones de flavopiridol, CPS49 o su combinación. Luego con un *tip* de micropipeta se realizaron heridas sobre las monocapas de los cultivos celulares confluentes. Se determinó el porcentaje de herida cerrada utilizando fotografías tomadas a distintos tiempos.

B.



**Figura 21. Modulación de la capacidad migratoria de las células PC3 por el tratamiento con flavopiridol, CPS49 o su combinación.** Se realizó una herida sobre una monocapa confluyente de células PC3 previamente expuesta a distintos tratamientos durante 16 horas. Se monitoreó el avance de células sobre la herida realizada con fotografías tomadas a 0; 5 y 10 horas. Se cuantificó el área invadida y se calculó el porcentaje de herida cerrada utilizando el programa Image J (Image Processing and Analysis in Java). La figura muestra el promedio de dos réplicas independientes y su desvío estándar. El asterisco (\*) indica que el valor es significativo con respecto al control ( $p < 0,5$ ).

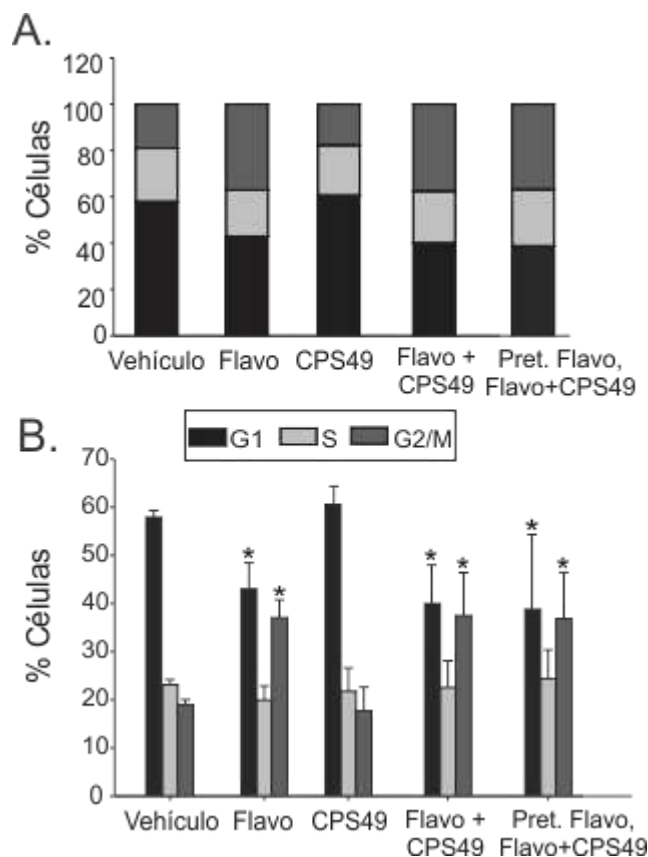
Es importante aclarar que el tratamiento con las drogas se llevó a cabo durante 16h y no durante 24 horas como en los ensayos de viabilidad ya que para poder evaluar la capacidad migratoria de las células necesitábamos una confluencia cercana al 90%, y el tratamiento con las drogas durante 24h reducía la confluencia de las células al momento de realizar la herida.

En la Figura 21 se muestra el porcentaje de herida cerrada por cada tratamiento en función del tiempo transcurrido. Podemos observar que transcurridas 5 horas de los tratamientos realizados no se vieron cambios en la migración de las células PC3. Sin embargo, a las 10 horas de tratamiento, podemos ver una diferencia significativa en la capacidad migratoria de las células tratadas con altas concentraciones de flavopiridol solo o combinado con CPS49. No obstante no observamos diferencias en la migración celular al realizar el tratamiento con CPS49 (Figura 21).

2.5. La combinación de flavopiridol y CPS49 induce arresto en el ciclo celular

La regulación del ciclo celular juega un rol crítico en la proliferación de las células tumorales. El flavopiridol es un agente antineoplásico definido como un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) debido a su alta afinidad a las mismas que induce arresto en el ciclo celular en varias líneas celulares (Carlson et al., 1996; Losiewicz et al., 1994)(Senderowicz, 2003).

Con el objetivo de estudiar si el tratamiento con dosis bajas de flavopiridol o su combinación con CPS49 inducen arresto en el ciclo celular, tratamos a las células PC3 con flavopiridol, CPS49 o sus combinaciones durante 24 horas y luego determinamos el contenido de ADN mediante la marcación con yoduro de propidio y realizamos su posterior análisis por citometría de flujo.

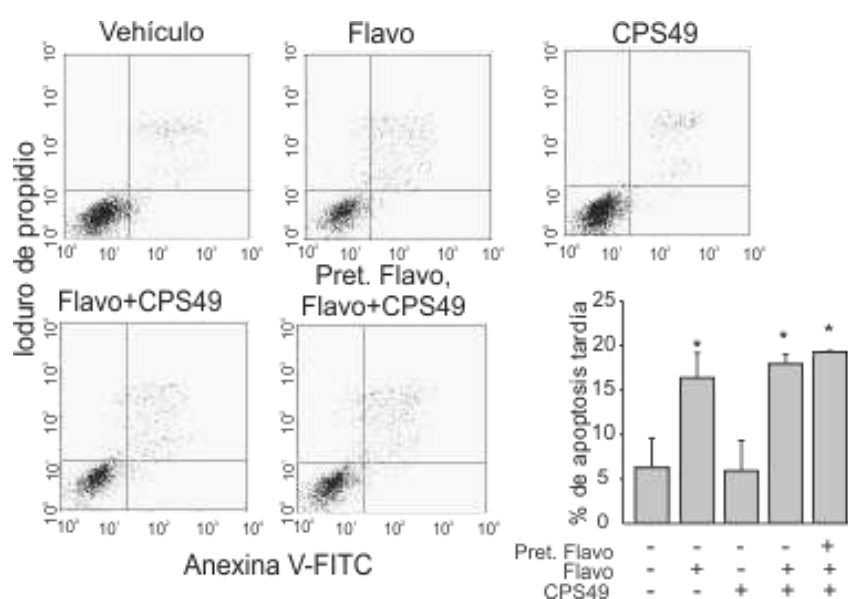


**Figura 22. Medición del contenido de ADN de las células PC3 tratadas con flavopiridol, CPS49 o sus combinaciones.** Las células PC3 fueron expuestas a los distintos tratamientos durante 24 horas. Luego se midió el contenido de ADN por marcación con yoduro de propidio y citometría de flujo. **A.** Promedio de 3 réplicas biológicas independientes de la cuantificación correspondiente a las distintas fases del ciclo celular. **B.** Promedio y desvío estándar de 3 réplicas biológicas independientes. El asterisco (\*) indica que el valor es significativo con respecto al vehículo ( $p < 0,5$ ).

Como podemos observar en la Figura 22 dosis bajas de flavopiridol inducen la acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular, disminuyendo el porcentaje de células en fase G1. La combinación de flavopiridol con CPS49, no interfiere en la habilidad de flavopiridol de arrestar el ciclo en esta línea celular, ya que los resultados observados en los tratamientos combinados (sin o con pretratamiento de flavopiridol) no mostraron variación respecto a las células que fueron tratadas con flavopiridol solamente

### 2.6. La combinación de flavopiridol y CPS49 induce apoptosis en la línea celular PC3

La administración de flavopiridol fue asociada a la inducción de apoptosis en células hematopoyéticas, mediante la activación de genes pro-apoptóticos y la disminución de genes antiapoptóticos (Kitada et al., 2000).



**Figura 23. Modulación del porcentaje de células PC3 en apoptosis luego del tratamiento con flavopiridol, CPS49 o sus combinaciones.** Las células fueron expuestas a los distintos tratamientos durante 24 horas. Luego fueron marcadas con anexina V-FITC e ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Los gráficos de puntos corresponden a un experimento representativo. Los gráficos de barra muestran el promedio y desvío estándar de tres réplicas biológicas independientes. El asterisco (\*) indica que el valor es significativo con respecto al vehículo ( $p < 0,5$ ).



En este trabajo de tesis evaluamos si el tratamiento de células PC3 con flavopiridol, CPS49 o su combinación altera la apoptosis utilizando el método de marcación con anexina V-FITC e ioduro de propidio seguida por análisis en citómetro de flujo.

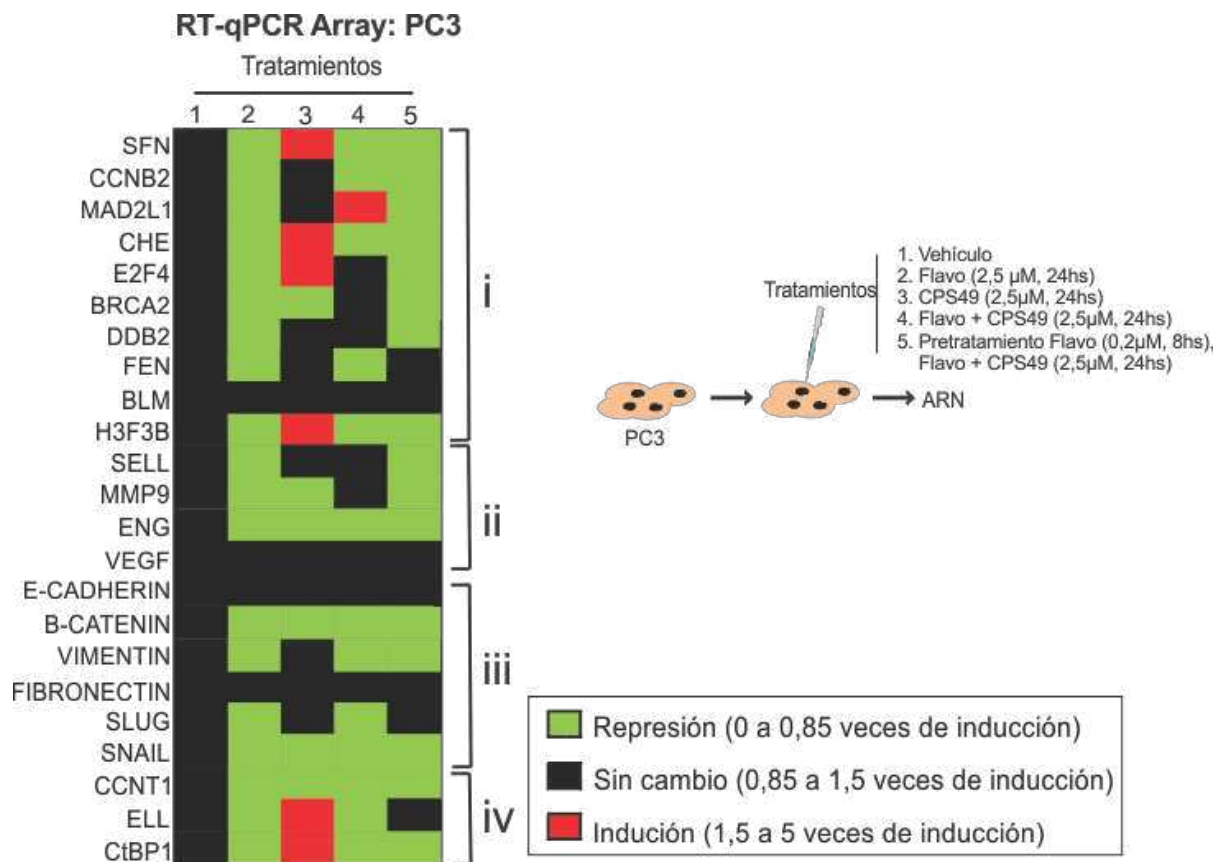
Asimismo, la combinación de CPS9 y flavopiridol induce apoptosis de las línea de leucemia a través de la inhibición de NF-Kb y disminuyendo la expresión de genes antiapoptóticos como Survivina, Bcl-2 y Bcl-XL (Ge et al., 2008).

El tratamiento con flavopiridol solo o en combinación con CPS49 (con o sin pretratamiento con flavopiridol), aumenta significativamente el porcentaje de células en apoptosis tardía comparado con el control (Figura 23).

### **2.7. El tratamiento de células PC3 con flavopiridol o su combinación con CPS49 reduce la expresión de genes involucrados en distintos procesos celulares**

Con el objetivo de determinar las vías transcripcionales que podrían estar moduladas por el tratamiento con flavopiridol, CPS49 o su combinación, aislamos ARN a partir de las líneas celulares PC3 que fueron expuestas a las drogas, y realizamos RT-qPCR de un grupo de genes (RT-qPCR array) utilizando *primers* específicos involucrados en diferentes procesos celulares como se detalla en materiales y métodos.

Los genes analizados se dividieron en 4 grupos (i) reguladores del ciclo celular y del daño en el ADN: SFN, CCNB2, MAD2L1, CHE, E2F4, BRCA2, DDB2, FEN, BLM, H3F3B; (ii) Adhesión, migración e invasión: SELL, MMP9, ENG, VEGF; (iii) marcadores de EMT: E-CADERINA, B-CATENINA, VIMENTINA, FIBRONECTINA, SLUG, SNAIL; iv) reguladores de la transcripción: CCNT1, ELL, CtBP1.



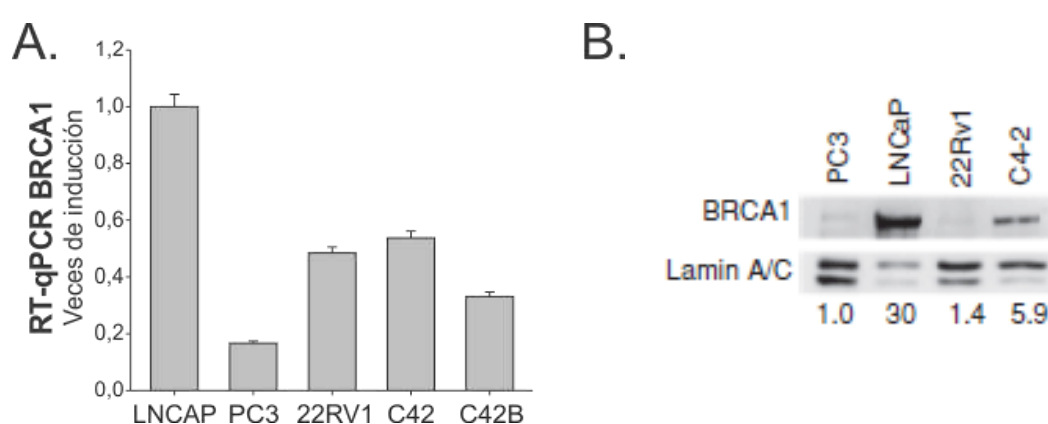
**Figura 24. Genes regulados en células PC3 tratadas con flavopiridol, CPS49 o sus combinaciones.** Las células PC3 fueron tratadas con flavopiridol, CPS49 o la combinación como se detalla en la figura durante 24 horas. Se aisló el ARN y se midió la expresión de distintos genes por RT-qPCR utilizando primers específicos. Se agruparon a los genes en 4 grupos de acuerdo a su participación en procesos celulares: (i) reguladores del ciclo celular y del daño en el ADN; (ii) Adhesión, migración e invasión; (iii) marcadores de EMT; (iv) reguladores de la transcripción. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes. Para confeccionar el RT-qPCR Array los resultados fueron agrupados en tres categorías distintas (Represión, Sin cambio e Inducción) según las veces de inducción obtenidas. En el gráfico se observan tres colores que corresponden a valores de represión significativos (verde), de inducción significativos (rojo) y sin variación (negro), comparados con el grupo 1 (Vehículo).  $p < 0,05$

***En conclusión, todos los resultados presentados hasta aquí demuestran que el tratamiento con la combinación de flavopiridol y CPS49 es efectivo y selectivo para las líneas celulares de PCa; y que esta combinación induce arresto en el ciclo celular y apoptosis, inhibe la formación de focos y regula la expresión de varios genes involucrados en distintos procesos celulares.***

## **CAPITULO III**

# **EFECTO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS SOBRE CÉLULAS TUMORALES CON DISTINTOS NIVELES DE BRCA1.**

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran un nuevo rol para el gen supresor de tumores BRCA1 en el PCa. Determinamos que la expresión de BRCA1 es diferente en las distintas líneas tumorales de próstata humanas, observándose la mayor expresión en la línea celular LNCaP (sensible a andrógenos) y la menor expresión en la línea PC3 (insensible a andrógenos), esto sugiere que la pérdida de la expresión de BRCA1 se podría correlacionar con la progresión de la enfermedad (De Luca et al., 2011)(Figura 25).



**Figura 25. Expresión de BRCA1 en líneas celulares de PCa. A)** Niveles de ARNm de cada línea celular, obtenidos mediante RT-qPCR utilizando primers específicos para BRCA1 y relativizados a Actina  $\beta$  y LNCaP. **B)** Extractos de proteínas totales de las líneas celulares de PCa se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra la proteína BRCA1 y Laminina A/C. Los números debajo de las bandas muestran la cuantificación de los niveles de expresión de BRCA1 realizado con el software Image J, relativizado a los niveles de expresión de laminina A/C y al valor de expresión de PC3. Extraído de la tesis doctoral de la Dra. Paola De Luca (FCEN – UBA).

Además, establecimos por primera vez un modelo *in vivo* de animales xenotransplantados con células de PCa que tienen disminuida la expresión de BRCA1 (De Luca et al., 2011). Inyectamos como xenotransplantes en ratones nude machos de 6 semanas las líneas celulares PC3 con expresión disminuida de BRCA1 (shRNA BRCA1) y su control (shRNA scramble), y medimos el crecimiento tumoral. La disminución de la expresión de BRCA1 aumentó significativamente el desarrollo tumoral *in vivo* a través de la modulación de la transcripción de varios genes (De Luca et al., 2011). Estos resultados sugieren por primera vez que BRCA1 podría estar funcionando como un

supresor tumoral en próstata probablemente a través de la regulación transcripcional de otros genes.

Más aun, está ampliamente investigado que la disminución o la falta total de la expresión de la proteína BRCA1 afecta la sensibilidad a las drogas antineoplásicas (Rottenberg et al., 2007)(Zander et al., 2010)(Quinn et al., 2003). Considerando el importante rol de BRCA1 en el PCa (De Luca et al., 2011)(Moiola et al., 2012), en este trabajo de tesis nos propusimos investigar el efecto sobre la sensibilidad a las combinaciones de las drogas en estudio, en un panel de líneas celulares de PCa que tienen diferentes niveles de expresión de BRCA1.

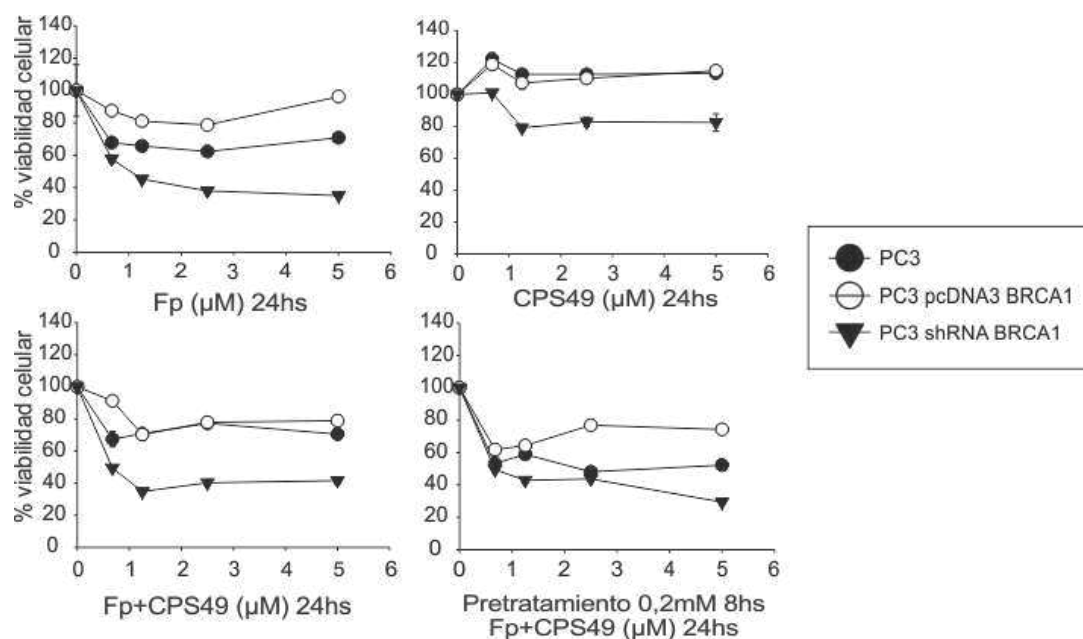
### **3.1. La baja expresión de BRCA1 aumenta la sensibilidad a la combinación de flavopiridol y CPS49 en el PCa**

Si analizamos los resultados presentados en el capítulo 2, desde el punto de vista de la expresión de BRCA1, observamos que las células que presentan menor expresión de BRCA1 son más sensibles a la combinación de CPS49 con flavopiridol (Figura 18). En particular, las líneas PC3 y 22Rv1, que presentan menor expresión de BRCA1, son las más sensibles a estos tratamientos. Asimismo, la línea LNCaP, con altos niveles de expresión de BRCA1, es insensible a la combinación de CPS49 con flavopiridol (Figura 18).

La diferencia a la sensibilidad a estas drogas puede deberse a muchos factores, entre ellos la expresión de BRCA1 puede jugar un rol. En base a esto nos propusimos estudiar el efecto de la sobreexpresión o el silenciamiento de BRCA1 en células PC3 frente al tratamiento con flavopiridol, CPS49, o sus combinaciones.

Para ello utilizamos las líneas celulares PC3 establemente transfectadas con el plásmido de sobreexpresión (pcDNA3 BRCA1) o con el plásmido de silenciamiento de BRCA1 (pkD shRNA BRCA1), generadas previamente en nuestro laboratorio (De Luca et al., 2011) y la línea PC3 original como control. En esas líneas celulares realizamos un ensayo de viabilidad celular luego del tratamiento con flavopiridol, CPS49 o sus combinaciones durante 24 horas.

Como podemos observar en la Figura 26, la línea celular que tiene menores niveles de BRCA1 (PC3 pKD shRNA BRCA1) fue más sensible al tratamiento con flavopiridol y su combinación con CPS49. En cambio la línea que tiene los mayores niveles de BRCA1 (PC3 pcDNA3 BRCA1) mostró ser más resistente a los tratamientos con estos agentes.



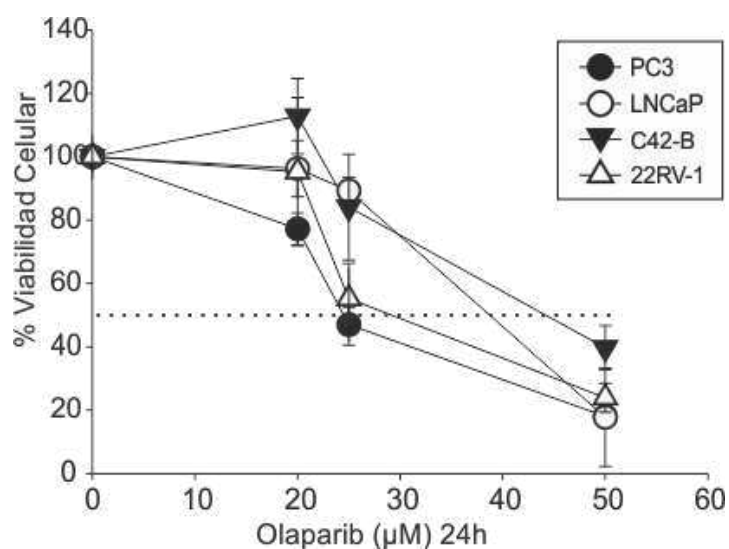
**Figura 26. Citotoxicidad del tratamiento combinado de flavopiridol y CPS49 en líneas celulares PC3 que tienen sobreexpresada o silenciada la expresión de BRCA1.** Las líneas estables PC3 que sobreexpresan (PC3 pcDNA3 BRCA1) o que tienen disminuida la expresión de BRCA1 (PC3 shRNA BRCA1) y el control se expusieron a distintas concentraciones de flavopiridol y/o CPS49 durante 24 hs; o fueron pretratadas con una baja concentración de flavopiridol durante 8h y luego se expusieron a la combinación de ambas drogas. Luego de los tratamientos se midió la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. Cada punto representa el promedio y desvío estándar de 3 repeticiones. Se muestra un experimento representativo de 2 réplicas biológicas independientes.

### 3.2. Las líneas celulares de PCa con baja expresión de BRCA1 son más sensibles al tratamiento con olaparib

Debido a que los inhibidores de Poly ADP ribose polymerase (PARP) son agentes antineoplásicos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de los tumores que tienen baja o nula expresión de BRCA1, y considerando que observamos un aumento de la sensibilidad a drogas con la disminución de la expresión de esta proteína, en este

trabajo de tesis intentamos determinar si la combinación de las drogas utilizadas en este proyecto con olaparib (inhibidor de PARP) mejoraba el efecto citotóxico en el PCa. Para ello en primer lugar realizamos un ensayo de viabilidad utilizando las líneas celulares de PCa que expresan distintos niveles de expresión de BRCA1 (PC3, 22Rv1, LNCaP y C4-2B). En esas líneas realizamos un tratamiento con concentraciones crecientes (0-50  $\mu$ M) de olaparib durante 24 horas y luego medimos la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS.

Como podemos observar en la Figura 27, las líneas celulares de PCa que presentan baja expresión proteica de BRCA1 (PC3 y 22Rv1) fueron sensibles al tratamiento con 25  $\mu$ M de olaparib, mientras que las líneas celulares de PCa que exhiben alta expresión de esta proteína (LNCaP y C42-B) fueron resistentes a esta concentración. Todas las líneas estudiadas fueron sensibles al tratamiento con 50  $\mu$ M de olaparib.



**Figura 27. Citotoxicidad de olaparib en líneas celulares de PCa.** Las líneas celulares PC3, LNCaP, C42-B y 22RV1 fueron expuestas a distintas concentraciones de olaparib (0 a 50  $\mu$ M). Luego de los tratamientos se midió la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. Cada punto representa el promedio y desvío estándar de 3 repeticiones independientes.

### 3.3. El olaparib aumenta la sensibilidad del flavopiridol y el CPS49 en las células PC3

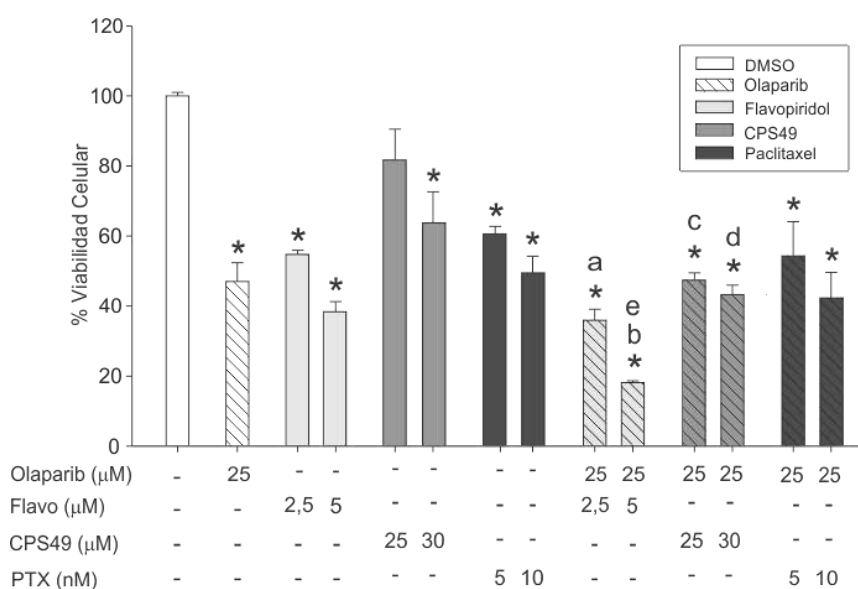
Habiendo encontrado una relación entre la sensibilidad de las líneas celulares de PCa al tratamiento con olaparib y la expresión de BRCA1, nos propusimos estudiar si el olaparib podría aumentar la sensibilidad de la línea PC3 al flavopiridol, CPS49 o paclitaxel. Nuevamente optamos por verificar esta hipótesis en la línea celular PC3 ya



que esta línea presenta los más bajos niveles de BRCA1 y es sensible al tratamiento con olaparib.

Para ello realizamos un ensayo de viabilidad celular donde tratamos a las células con las drogas como únicos agentes (25  $\mu$ M de olaparib; 1,5 o 5  $\mu$ M de flavopiridol; 25 o 30  $\mu$ M de CPS49 y 5 o 10 nM de paclitaxel) o con combinaciones de olaparib (25  $\mu$ M) con cada una de las dosis de flavopiridol, CPS49 y paclitaxel. Luego de 24 horas de tratamiento, medimos la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS.

Como podemos observar en la Figura 28, la combinación de olaparib con flavopiridol o con CPS49, redujo significativamente la viabilidad celular de la línea PC3, comparada con el tratamiento con flavopiridol o CPS49 solos. Únicamente el tratamiento con 5  $\mu$ M de flavopiridol, disminuyó significativamente el porcentaje de viabilidad celular comparado con el tratamiento con olaparib como único agente. En el caso de la combinación con olaparib y CPS49, los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con olaparib como monodroga, por lo que no podríamos determinar con éste ensayo si el resultado es debido solamente a la acción de olaparib.



**Figura 28. Ensayo de viabilidad en células PC3 tratadas con combinaciones de olaparib y flavopiridol, CPS49 o paclitaxel.** La línea celular PC3 fue expuesta a combinaciones de olaparib (25  $\mu$ M) con flavopiridol (2,5 y 5  $\mu$ M), CPS49 (25 y 30  $\mu$ M) o paclitaxel (5 y 10 nM). Luego de los tratamientos se midió la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS. Cada punto representa el promedio y desvío estándar de 2 repeticiones. \* $p < 0,05$  vs control; a $< 0,05$  vs 2,5 $\mu$ M Flavo; b $< 0,05$  vs 5 $\mu$ M Flavo; c $< 0,05$  vs 25 $\mu$ M CPS49; d $< 0,05$  vs 30 $\mu$ M CPS49; e $< 0,05$  vs 25 $\mu$ M Olaparib.

Por último los resultados obtenidos al combinar olaparib con paclitaxel fueron muy similares a aquellos alcanzados con paclitaxel y olaparib como mono droga. (Figura 28)

***A partir de los resultados de esta sección, podemos concluir que la deficiencia en la expresión de BRCA1 en el PCa aumenta la sensibilidad al tratamiento con flavopiridol, CPS49, olaparib y sus combinaciones. Por lo tanto estas drogas serían efectivas para un subgrupo de pacientes con PCa y deficientes en la expresión de BRCA1.***

## **CAPÍTULO 4**

# **ESTUDIOS *IN VIVO* UTILIZANDO CPS49, FLAVOPIRIDOL Y PACLITAXEL PARA LA TERAPIA DEL PCA**

El avance del flavopiridol en ensayos clínicos no fue satisfactorio a pesar de ser efectivo en varios estudios preclínicos en PCa. Utilizado como único agente, el flavopiridol produce la estabilización de la enfermedad por un determinado tiempo. Sin embargo, se observó en los pacientes una alta toxicidad gastrointestinal con eventos hematológicos o neurológicos (Liu et al., 2004). A pesar de la respuesta insatisfactoria como único agente, actualmente se postula como promisorio la evaluación del uso del flavopiridol en terapias combinadas con otros agentes antitumorales. La mayoría de las estrategias para una terapia efectiva contra el cáncer emplean combinaciones de drogas diseñadas para dirigirse a varios componentes dentro de las vías biológicas que se cree que son críticas para el crecimiento y supervivencia tumoral.

Por otro lado la talidomida, un potente inhibidor de la angiogénesis, demostró tener actividad antitumoral en numerosos protocolos con pacientes (Barlogie et al., 2001; Fine et al., 2000; Little et al., 2000; Rajkumar et al., 2000), pero los efectos colaterales que se presentaron en los pacientes llevaron al desarrollo de nuevos análogos estructurales como el CPS49 y los de la serie GU investigados en este trabajo de tesis.

Estudios previos de otros autores demostraron que altas dosis de flavopiridol (10 mkg/día) (Jiao et al., 2008) o de CPS49 (12 mg/kg/day) (Ng et al., 2004) son necesarias para inhibir el crecimiento tumoral en xenotransplantes originados a partir de la inoculación de células PC3 en ratones nude. En el caso de paclitaxel las dosis necesarias para inhibir el crecimiento tumoral a partir de la línea LNCaP es de 20 mg/Kg/día (Chen et al., 2003).

En base a esto, y con el objetivo de reducir los efectos nocivos en pacientes y mejorar los efectos antitumorales de estas drogas, en este trabajo de tesis decidimos investigar el efecto *in vivo* de la terapia con flavopiridol, CPS49 o paclitaxel, y las combinaciones entre estos agentes, reduciendo así las dosis aplicadas de cada droga a la mitad de las previamente publicadas. Para ello inyectamos en forma subcutánea en ratones nude la línea humana tumoral PC3 y evaluamos el crecimiento tumoral en función del tiempo. Elegimos esta línea celular debido a que mostró la mayor respuesta frente al tratamiento con los compuestos utilizados y/o sus combinaciones en los ensayos *in vitro*.

#### **4.1. El tratamiento con flavopiridol o CPS49 reduce el crecimiento tumoral en xenotransplantes originados a partir de células PC3**

Para realizar los estudios *in vivo* inyectamos  $10^6$  células PC3 s.c. en el flanco derecho de los ratones nude. Luego de tres semanas, los tumores alcanzaron un volumen entre 50 y 100 mm<sup>3</sup> y los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos: 1) CONTROL: tratados con DMSO; 2) Flavo: tratados con 6 mg/kg/día de flavopiridol; 3) CPS49: tratados con 6 mg/kg/día de CPS49 y 4) PTX: tratados con 10 mg/kg/día de paclitaxel, según se detalla en el protocolo de la Figura 29A.

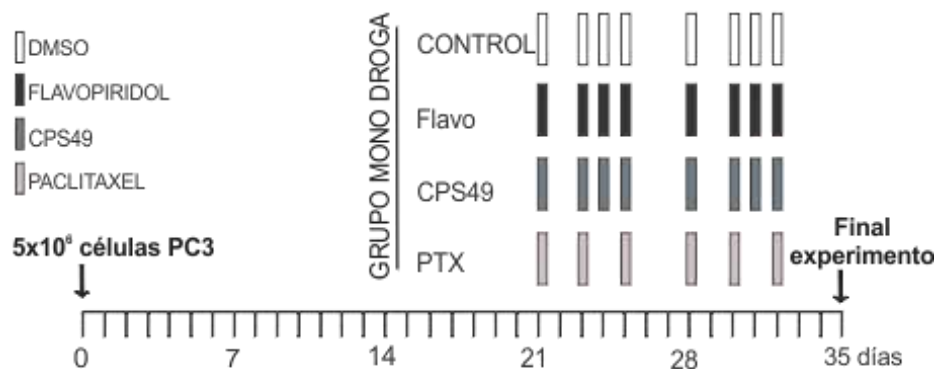
A partir de los 7 días desde la inyección de las células, los tumores fueron medidos utilizando un calibre digital cada dos días hasta el final del experimento.

Como podemos observar en la FIGURA 29B el tratamiento con bajas dosis de flavopiridol (día 33 y 35 p.i.) o CPS49 (día 35 p.i.) redujeron significativamente el volumen de los tumores. Sin embargo, dosis bajas de paclitaxel no disminuyeron el crecimiento tumoral comparado con el control.

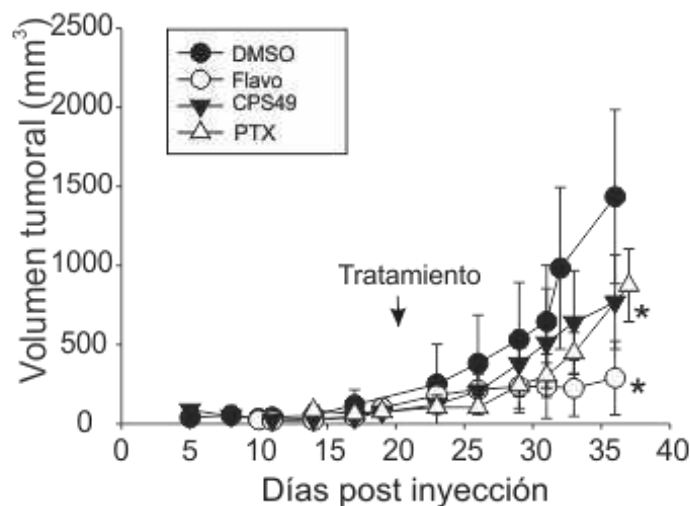
Llegando al final del experimento, el 50% de los animales tratados con flavopiridol murieron, por lo que decidimos terminar el experimento en ese momento, de forma de no perjudicar a los animales y de poder analizar el resultado con la mayor cantidad de datos posible. Debido a que no hemos observado alguna otra causa posible, creemos que estos animales murieron por efectos secundarios del flavopiridol. El resto de los grupos (Control, CPS49 y PTX) presentaron una tasa de mortalidad baja (<5%) comparada con la de los animales tratados con flavopiridol.

Para poder analizar la toxicidad de las drogas ensayadas en los animales, se midió el peso de los animales una vez por semana a lo largo de todo el experimento, y se realizó un análisis histológico del hígado, riñón y pulmón de cada animal al final del experimento. No hallamos diferencias significativas en el peso de los animales a lo largo del experimento. El análisis histológico de los órganos llevado a cabo por el Dr. Roberto Meiss (Jefe de Patología de la Academia Nacional de Medicina), mostró que no se observaron diferencias significativas en los órganos de los animales tratados comparados con los del grupo control (datos no mostrados).

### A. Protocolo Experimental



### B. Crecimiento tumoral: Grupo mono droga



**Figura 29. Crecimiento tumoral en ratones xenotransplantados originados a partir de la inoculación de células PC3 y luego tratados con flavopiridol, CPS49 o paclitaxel. A. Protocolo experimental:** Ratones machos nu/nu de 5 semanas de edad fueron inoculados con células PC3 ( $5 \times 10^6$  células) s.c. Cuando los tumores alcanzaron un volumen entre 50 y 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron al azar en 4 grupos (n=7) y se le inocularon las drogas en forma i.p. de la siguiente manera: Grupo Control: 4 inyecciones de vehículo o DMSO por semana durante 2 semanas; Grupo Flavo: 4 inyecciones de flavopiridol (6 mg/kg/día) por semana durante 2 semanas; Grupo CPS49: 4 inyecciones de CPS49 (6 mg/kg/día) por semana durante 2 semanas; Grupo PTX: 3 inyecciones de paclitaxel (20 mg/kg/día) por semana durante 2 semanas. **B. Gráfico del crecimiento tumoral:** El tamaño tumoral se determinó 3 veces por semana. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral que representan el promedio y desvío estándar de las mediciones de los ratones. El asterisco (\*) indica que el valor es significativo con respecto al control ( $p < 0,5$ ).

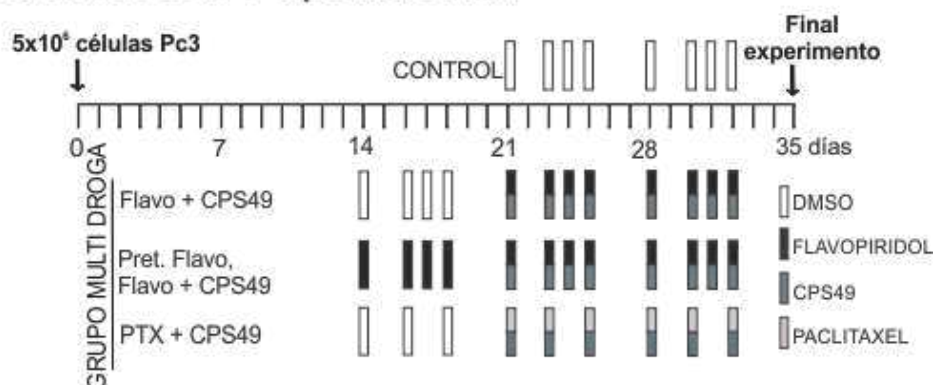
***A partir de estos resultados podemos concluir que dosis bajas de flavopiridol o CPS49 disminuyen el crecimiento de los xenotransplantes originados a partir de células PC3. Sin embargo, la toxicidad del flavopiridol pareciera ser todavía alta debido a que la tasa de mortalidad de este grupo fue del 50%.***

#### **4.2 La combinación de flavopiridol y CPS49 disminuyó el crecimiento tumoral en xenotransplantes originados a partir de células PC3**

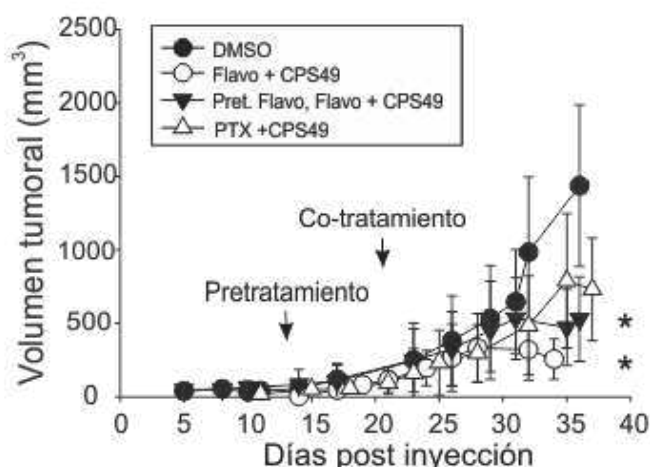
A partir de los resultados obtenidos en el crecimiento tumoral de los animales tratados con flavopiridol o CPS49 como monodroga, decidimos estudiar el efecto de la combinación de estas drogas con el objetivo de aumentar la eficacia de cada droga y disminuir los efectos no deseados. A pesar de que el paclitaxel como monodroga utilizado a bajas dosis no logró disminuir el crecimiento tumoral, decidimos probar también la combinación de CPS49 y paclitaxel basándonos en la hipótesis que la combinación podría mejorar el efecto antitumoral de cada droga por separado.

De la misma forma que en el tratamiento anterior, los animales nude fueron inyectados con células PC3. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de entre 50 y 100 mm<sup>3</sup>, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos: 1) CONTROL: tratados con DMSO, 2) Flavo + CPS49: durante la primer semana se los trató con DMSO, y las dos semanas siguientes con 6 mg/kg/día de flavopiridol y CPS49, 3) Pret. Flavo, Flavo + CPS49: durante la primer semana se inyectaron 2 mg/kg/día de flavopiridol, y las siguientes dos semanas 6 mg/kg/día de flavopiridol y CPS49; 4) PTX + CPS49: se inyectó DMSO durante la primer semana y las dos semanas siguientes se inyectaron 10 mg/Kg/día de paclitaxel y 6 mg/kg/día de CPS49, según se detalla en el protocolo de la Figura 30 A.

### A. Protocolo Experimental



### B. Crecimiento tumoral: Grupo multi droga



**Figura 30. Crecimiento tumoral en ratones xenotransplantes originados a partir de células PC3 tratados con combinaciones de CPS49 y flavopiridol o paclitaxel. A. Protocolo experimental.** Ratones machos nu/nu fueron inoculados con células PC3 s.c. Los animales fueron divididos en 4 grupos luego de que los tumores alcanzaran entre 50 y 100 mm<sup>3</sup> y se le inocularon las drogas en forma i.p. de la siguiente manera: 1) Grupo Control: 4 inyecciones de vehículo o DMSO por semana durante 2 semanas; 2) Grupo Flavo + CPS49: 4 inyecciones de DMSO durante la primer semana, y luego 4 inyecciones de flavopiridol y CPS49 (6 mg/kg/día) por semana, durante las dos semanas siguientes; 3) Grupo Pret. Flavo, Flavo + CPS49: 4 inyecciones de flavopiridol (2 mg/kg/día) durante la primer semana, y luego 4 inyecciones de flavopiridol y CPS49 (6 mg/kg/día) por semana, durante las dos semanas siguientes; 4) Grupo PTX: 4 inyecciones de DMSO durante la primer semana, y luego 3 inyecciones de paclitaxel (20 mg/kg/día) y CPS49 (6 mg/kg/día) por semana, durante 2 semanas. **B. Gráfico del crecimiento tumoral.** El tamaño tumoral se determinó 3 veces por semana. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral que representan el promedio y desvío estándar de las mediciones de los ratones. El asterisco (\*) indica que el valor es significativo con respecto el control ( $p < 0,5$ ).



El tratamiento de los animales con la combinación de flavopiridol y CPS49 (Grupo Flavo + CPS49) disminuyó significativamente el volumen tumoral luego de 2 semanas de cotratamiento (83% comparado con el grupo control) (Figura 30B). Además pudimos observar que el pretratamiento durante una semana con bajas dosis de flavopiridol y luego el cotratamiento con flavopiridol y CPS49 durante 2 semanas (Grupo Pret. Flavo + CPS49), también redujo significativamente el volumen tumoral comparado con el grupo control (54%). Sorprendentemente, la tasa de mortalidad de estos tratamientos fue menor a la observada en el grupo tratado con flavopiridol (menor al 5%).

En el caso del tratamiento combinado con bajas dosis de paclitaxel y CPS49 (Grupo PTX + CPS49), no observamos una reducción del crecimiento tumoral significativa (Figura 30 B).

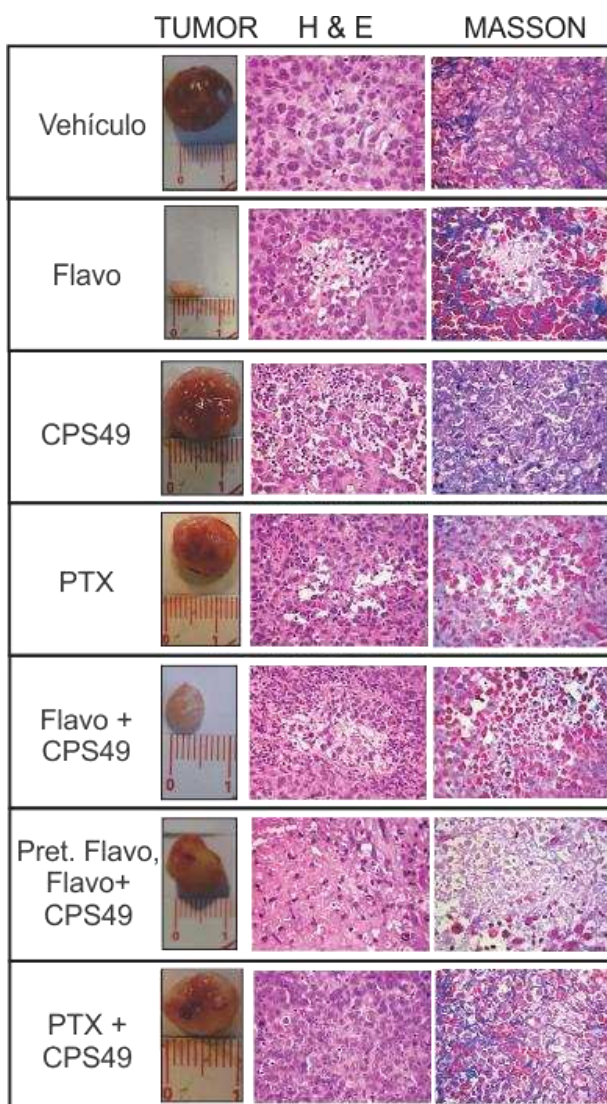
***Estos resultados nos permiten concluir que la combinación de flavopiridol y el CPS49 en dosis bajas, con o sin pretratamiento con flavopiridol, disminuye el crecimiento tumoral originado a partir de células PC3. La combinación de paclitaxel con CPS49 no presentó diferencias significativas comparadas con el tratamiento de paclitaxel o CPS49 como monodrogas. Estos resultados describen una nueva estrategia terapéutica que reduce el volumen tumoral utilizando bajas dosis de estas drogas en estudios preclínicos.***

#### **4.3. Análisis histológicos de los tumores extraídos de ratones nude expuestos a distintos tratamientos**

Al finalizar el experimento los tumores fueron extraídos y fotografiados. En la figura 31 se presentan fotografías representativas de los tumores en las que podemos observar la diferencia en el tamaño tumoral, congruente con el volumen medido en cada grupo, y el color de los tumores relacionados con la vascularización presente en cada tumor. Los tumores más pequeños fueron los extraídos de animales que recibieron el tratamiento con flavopiridol solo o en combinación con CPS49. El tumor extraído del grupo de animales que recibió tratamiento con el vehículo se caracteriza por su gran tamaño y su color rojo. En cambio, los tumores de animales que recibieron tratamiento con CPS49 solo o en combinación con flavopiridol o paclitaxel, presentaron un color menos rojizo,

que se podría deber a la potente actividad anti angiogénica de este análogo de la talidomida.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos moleculares y celulares que están involucrados en los tratamientos con las distintas drogas, los tumores fueron seccionados para hacer análisis de ARN y análisis histológicos al finalizar el experimento. Para realizar el análisis histológico las muestras fueron conservadas en formalina tamponada 10% y enviadas a la Academia de Medicina, donde el Dr. Meiss realizó las tinciones y describió el patrón histológico observado. El grupo control se caracterizó como adenocarcinomas pobremente diferenciados con la trama epitelial fibroreticular preservada (Figura 31). El grupo tratado con flavopiridol (Grupo Flavo) o paclitaxel (Grupo PTX) indujo focos de necrosis de células tumorales y pérdida de la trama fibroreticular.



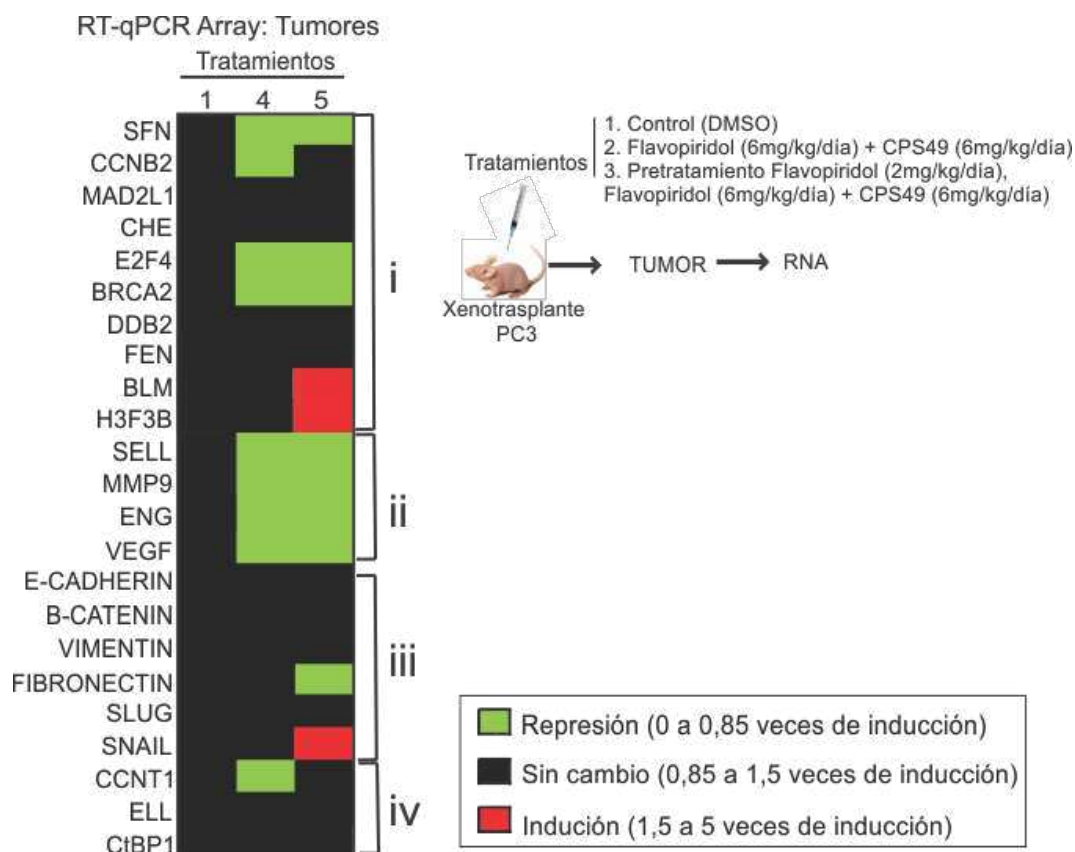
**Figura 31. Tinciones histológicas en cortes de tumores generados por inoculación de células PC3 en los ratones nude que fueron expuestos a distintos tratamientos.** Muestras tumorales de distintos grupos de tratamientos fueron teñidas con hematoxilina y eosina o se les realizó la técnica histológica tricrómica de Masson y luego fotografiadas. En la figura se muestra una foto representativa de cada tinción y del tumor extraído de los animales al momento de finalizar el experimento.

Estos resultados coinciden con los resultados *in vitro*, en los que en las células PC3 tratadas con flavopiridol se observaba el aumento de muerte celular por apoptosis, y con los resultados *in vivo* de los grupos tratados con flavopiridol o paclitaxel donde observábamos un crecimiento tumoral disminuido comparado con el grupo control. El análisis histológico de los tumores extraídos de los animales tratados con la combinación de flavopiridol y CPS49 con o sin pretratamiento con flavopiridol, mostró áreas extensas de necrosis con pérdida moderada a completa de la trama fibroreticular (Figura 31). El análisis de los tumores pertenecientes al grupo tratado con paclitaxel y CPS49 reveló una trama fibroreticular y células tumorales relativamente bien conservadas, coincidentemente con los resultados obtenidos a partir de la medición del volumen tumoral en este grupo.

#### **4.4. El tratamiento combinado de flavopiridol y CPS49 *in vivo* reprime genes involucrados en migración, adhesión e invasión**

Con el objetivo de determinar las vías transcripcionales que estaban siendo moduladas por el tratamiento con la combinación de flavopiridol y CPS49 *in vivo*, aislamos ARN a partir de los tumores originados de la línea celular PC3 y realizamos RT-qPCR *array* de los mismos genes que evaluamos en la Figura 32 realizado a partir del tratamiento en las células PC3.

La combinación de flavopiridol y CPS49 con o sin pretratamiento no alteró los niveles de expresión de la mayoría de los genes estudiados en los tumores. Aunque pudimos encontrar un set de genes involucrados en adhesión, migración e invasión (SELL, MMP9, ENG, VEGF) cuya expresión se encontró significativamente reprimida (Figura 32).



**Figura 32.** Genes regulados en tumores de PC3 trasplantados en ratones nude a los que se les administro la combinación de **Flavopiridol y CPS49**. Los animales fueron tratados con la combinación de flavopiridol y CPS49, con o sin pretratamiento de flavopiridol, como se detalla en la figura. Luego de sacrificar a los animales, se aisló el ARN a partir del tumor y se midió la expresión de distintos genes por RT- qPCR utilizando primers específicos. Se agruparon a los genes en 4 grupos de acuerdo a su participación en procesos celulares: (i) reguladores del ciclo celular y del daño en el ADN; (ii) Adhesión, migración e invasión; (iii) marcadores de EMT; iv) reguladores de la transcripción. En el gráfico se observan tres colores que corresponden a valores de represión significativos (verde), de inducción significativos (rojo) y sin variación (negro), comparados con el grupo 1 (Vehículo).  $p < 0,05$

**A partir de estos resultados podemos concluir que el CPS49 aumenta el efecto antitumoral del flavopiridol e induce necrosis tumoral, disminuyendo la tasa de mortalidad y reprimiendo genes involucrados en adhesión, migración e invasión. El paclitaxel en combinación con CPS49 no mostró diferencias significativas comparadas con el grupo control o el grupo tratado con paclitaxel solamente.**

**En resumen en este trabajo de tesis presentamos por primera vez una nueva estrategia para reducir el volumen tumoral en un modelo preclínico de PCa utilizando dosis bajas de flavopiridol y el agente antiangiogénico CPS49.**

# **CONCLUSIONES**

### **Estudios *in vitro* con análogos de talidomida**

Los análogos de talidomida GU990 Y GU998 son buenos candidatos antitumorales para combinar con otros compuestos en modelos pre-clínicos de PCa en dosis altas. EICPS49 es un candidato más eficaz como agente antitumoral que potencialmente se podría utilizar en el tratamiento del PCa.

### **Estudios *in vitro* e *in vivo* de la combinación del análogo de talidomida CPS49 con flavopiridol o paclitaxel**

La combinación de bajas dosis de CPS49 con flavopiridol disminuye la viabilidad celular de las líneas celulares de PCa, inhibe la formación de colonias en la línea PC3 y disminuye la capacidad migratoria de las células PC3, induciendo arresto y apoptosis y reduciendo la expresión de genes involucrados en distintos procesos celulares. Este tratamiento también reduce el crecimiento tumoral en xenotransplantes originados a partir de células PC3, aunque la toxicidad del flavopiridol aún sigue siendo alta. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que la combinación de flavopiridol y el CPS49 en dosis bajas, con o sin pretratamiento con flavopiridol, disminuye el crecimiento tumoral de xenotransplantes originados a partir de la inoculación de células PC3, induce necrosis tumoral, disminuye la tasa de mortalidad de los ratones y reprime genes involucrados en adhesión, migración e invasión

La combinación de paclitaxel con CPS49 estudiada en este trabajo no presentó diferencias significativas comparadas con el tratamiento de paclitaxel o CPS49 como mono drogas.

### **Efecto de drogas antineoplásicas sobre células tumorales con distintos niveles de BRCA1**

La baja expresión de BRCA1 en PCa aumenta la sensibilidad a flavopiridol, CPS49, olaparib y sus combinaciones. Proponemos estos agentes como posible terapia dirigida para aquellos pacientes con PCa y mutaciones en el gen de BRCA1.

# **DISCUSIÓN**

El cáncer de próstata es una de las enfermedades más comunes y es la segunda causa de muerte más frecuente por cáncer en hombres. La terapia con ablación de andrógenos es eficaz en aquellos pacientes que son diagnosticados en etapas tempranas de esta enfermedad, y es considerada una terapia paliativa para pacientes con metástasis debido a que la enfermedad progresará eventualmente. Es en esta etapa de la enfermedad en la que se debe invertir nuevos estudios de agentes y esquemas de tratamiento, debido a que actualmente no existe una terapia que disminuya totalmente la progresión tumoral. Así, una vez que el cáncer se vuelve refractario a la terapia hormonal o a la castración (CRPC), comienza el tratamiento quimioterapéutico basado en taxoles (docetaxel o paclitaxel). Este tratamiento ofrece un beneficio de supervivencia durante un tiempo, pero eventualmente las células de PCa desarrollan resistencia a esta quimioterapia. Para poder ofrecer una respuesta a esta resistencia en CRPC es esencial identificar nuevos blancos y estrategias terapéuticas.

Uno de los mayores objetivos de las investigaciones actuales en terapias antitumorales es el desarrollo de nuevas terapias con mayor selectividad hacia las células tumorales y menores efectos secundarios en pacientes. La estrategia de una terapia metronómica podría reducir las dosis de los agentes utilizados, aumentando de esta manera tanto la efectividad como la tolerabilidad de las terapias.

En este trabajo nos propusimos mejorar las terapias contra el PCa avanzado reduciendo las dosis de las drogas utilizadas y los efectos secundarios en pacientes.

Hemos demostrado que la reducción a la mitad de la dosis de flavopiridol previamente reportada, fue efectiva para reducir el crecimiento tumoral. Aun así el uso de este agente como monodroga presenta una alta mortalidad en ensayos *in vivo*.

El CPS49 utilizado como único agente, fue también efectivo para reducir el crecimiento tumoral, y no presentó mortalidad en los animales, pero no es tan eficiente como el flavopiridol.

Al combinar estos dos compuestos en una terapia metronómica, observamos un aumento en la necrosis celular tumoral y por lo tanto un aumento en la eficacia y tolerabilidad de la terapia.

Con los estudios realizados en el presente trabajo no pudimos descubrir por qué esta combinación muestra tener una mayor tolerabilidad que el tratamiento con flavopiridol como único agente en los estudios *in vivo*. Previamente fue reportado que el CPS49



parecería antagonizar la capacidad de flavopiridol de estabilizar la actividad de E2F-1 en células de leucemia (Ge et al., 2008). Este efecto antagonista podría influir en la respuesta *in vivo*.

Con el objetivo de poder dilucidar qué mecanismos moleculares estaban involucrados en la respuesta tumoral a la combinación de estas drogas, estudiamos el efecto de esta terapia en distintos procesos celulares. Encontramos así que bajas dosis de flavopiridol reducen la proliferación celular, induciendo arresto en el ciclo y apoptosis. Aunque el CPS49 como monodroga no moduló dichos procesos celulares a bajas concentraciones, la combinación de flavopiridol y CPS49 aumentó la reducción de la viabilidad celular de aquellas líneas de PCa representativas de estadios más avanzados de la enfermedad.

El CPS49 es un potente inhibidor de la angiogénesis. Este proceso celular ha sido considerado como un blanco especial para la terapia antitumoral. Las propiedades antiangiogénicas ya reportadas del CPS49 podrían explicar el aumento de los focos de necrosis observados en los tumores así como la disminución de la expresión de los genes relacionados con adhesión, migración e invasión en los tumores de los animales tratados con la combinación de flavopiridol y CPS49.

Nuestro laboratorio, en colaboración con el Dr. Gardner, demostró que esta combinación induce toxicidad selectiva para células de leucemia asociada a un desbalance mitocondrial y un aumento de los niveles de ROS (Ge et al., 2008). Analizando los blancos transcripcionales de esta terapia combinada se descubrió que estas drogas inician un programa transcripcional específico en estas células que modula la actividad de NF- $\kappa$ B, E2F-1 y p73 promoviendo la inestabilidad mitocondrial, elevando la expresión de factores proapoptóticos (BAX, BAD, p73 y PUMA) y reduciendo la expresión de factores antiapoptóticos (MCL1, XIAP, BCL-xL, SURVIVIN y MDM2).

**En base a estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos una nueva terapia prometedora para el PCa basada en la co-administración de flavopiridol y CPS49. Cada uno de estos agentes ataca blancos moleculares distintos, aumentado la toxicidad celular tumoral, y disminuyendo los efectos secundarios en estudios pre-clínicos.**

En línea con el objetivo general de este trabajo, también estudiamos la respuesta antitumoral combinando el CPS49 con paclitaxel. Dicha combinación fue altamente citotóxica *in vitro*, pero no disminuyó significativamente el crecimiento tumoral ni mostró

un aumento en los focos de necrosis o en la trama tumoral en el modelo *in vivo*. Estos resultados sugieren que la combinación no fue efectiva en este modelo y debería ser evaluada en otras dosis o esquemas de tratamiento, o combinados con otros taxoles, como el docetaxel.

La talidomida como potente inhibidor de la angiogénesis, ha impulsado el desarrollo de nuevos análogos. Dentro del análisis de distintos agentes antiangiogénicos, evaluamos la respuesta antitumoral en células de PCa de 7 nuevos análogos generados en el laboratorio del Dr. Figg. Así como con el CPS49, estos análogos evaluados como únicos agentes, necesitan ser administrados en altas concentraciones para disminuir la viabilidad celular de las líneas de PCa, y en estas concentraciones son también citotóxicos para líneas no tumorales, lo que permite extrapolar efectos secundarios importantes en estas dosis. En este estudio hallamos dos análogos (GU990 y GU998) que fueron selectivos para todas las líneas de PCa salvo para LNCaP, que resultó ser resistente a estos agentes. Más aún, evaluamos como fue modulada la capacidad clonogénica de la línea PC3 tratada con distintas dosis de ambos análogos y descubrimos que la formación de colonias es inhibida totalmente para esta línea.

**Este hallazgo interesante permite pensar en dos agentes novedosos, efectivos y selectivos para etapas avanzadas de PCa que podrían ser evaluados en combinación con otros agentes.**

**A pesar de estos resultados novedosos, no podemos dejar de lado que la línea no tumoral evaluada resultó ser sensible a estos agentes nuevos. Por lo que es necesario continuar este estudio evaluando dosis intermedias y combinaciones que generaran un tratamiento más selectivo para las células tumorales.**

Otra de las estrategias que se analizó en este trabajo fue la relacionada con el gen supresor de tumores BRCA1. Está ampliamente discutida y reportada la relación entre la progresión del PCa y la presencia de mutaciones en dicho gen. Más aún en nuestro laboratorio, demostramos por primera vez que BRCA1 estaría funcionando como un gen supresor tumoral en próstata a través de la regulación transcripcional de otros genes (De Luca et al., 2011).

También existen varios reportes que demuestran una relación entre la presencia de mutaciones en el gen de BRCA1 y la respuesta a las distintas terapias en cáncer de

mama. Por lo que quisimos estudiar el efecto de la modulación de BRCA1 en la sensibilidad de las líneas celulares de PCa frente al tratamiento con la combinación de flavopiridol y CPS49. En primer lugar observamos que las líneas que menor expresión de BRCA1 presentan son las más sensibles a este tratamiento. En un segundo abordaje, estudiamos el efecto de la modulación en la respuesta celular al tratamiento en la línea celular PC3, y observamos la misma relación a la que se había llegado en primera instancia.

**Por lo que en este trabajo encontramos un nuevo ejemplo de cómo el gen supresor tumoral BRCA1 regula la sensibilidad de las células a las terapias antitumorales.**

Ahondando más aún en la relación de la expresión de BRCA1 con los tratamientos para el PCa, decidimos abordar una nueva propuesta terapéutica en la que el blanco molecular era el supresor tumoral, utilizando un inhibidor de PARP. **Los resultados obtenidos nos permitieron revalidar el resultado anterior relacionado a BRCA1 y al tratamiento combinado de flavopiridol y CPS49, así como proponer una terapia con olaparib, flavopiridol y CPS49 para aquellos pacientes de PCa que presenten deficiencias en la expresión de BRCA. Este resultado permite abrir un nuevo horizonte de estudio para terapias personalizadas.**

Acorde con el objetivo de este trabajo, estudiamos varias estrategias terapéuticas en estadios pre-clínicos para el PCa avanzado. La mayoría de las terapias evaluadas, todavía requieren de una profundización del estudio, sumando ensayos *in vivo* que permitan validar los resultados observados en células, así como distintos ensayos *in vitro* que permitan dilucidar los mecanismos moleculares o celulares responsables de las respuestas observadas.

Para concluir, entre todos los agentes y estrategias evaluados en este trabajo, la propuesta más completa y prometedora es la combinación del CPS49 con el flavopiridol. Esta propuesta respondió a los puntos deseables de una nueva terapia antitumoral: selectividad, efectividad antitumoral y disminución de los efectos secundarios. A pesar de habernos acercado a los mecanismos que pudieran dar explicación a la respuesta tumoral a estos agentes, todavía es necesario un estudio más específico y profundo de los genes y mecanismos celulares involucrados.

# **REFERENCIAS**

- Abate-Shen, C., and Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14, 2410-2434.
- Abrahamsson, P. A., Cockett, A. T., and di Sant'Agnese, P. A. (1998). Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Suppl* 8, 37-42.
- Agalliu, I., Gern, R., Leanza, S., and Burk, R. D. (2009). Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations. *Clin Cancer Res* 15, 1112-1120.
- Ame, J. C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 882-893.
- Antonarakis, E. S., and Armstrong, A. J. (2011). Evolving standards in the treatment of docetaxel-refractory castration-resistant prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases* 14, 192-205.
- Aragon-Ching, J. B., Li, H., Gardner, E. R., and Figg, W. D. (2007a). Thalidomide analogues as anticancer drugs. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 2, 167-174.
- Attard, G., Sarker, D., Reid, A., Molife, R., Parker, C., and de Bono, J. S. (2006). Improving the outcome of patients with castration-resistant prostate cancer through rational drug development. *British journal of cancer* 95, 767-774.
- Audeh, M., Penson, R., Friedlander, M., Powell, B., Bell-McGuinn, K., Scott, C., Weitzel, J., Carmichael, J., and Tutt, A. (2009). Phase II trial of the oral PARP inhibitor olaparib (AZD2281) in BRCA-deficient advanced ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 5500.
- Balk, S. P., Ko, Y. J., and Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 21, 383-391.
- Barlogie, B., Desikan, R., Eddlemon, P., Spencer, T., Zeldis, J., Munshi, N., Badros, A., Zangari, M., Anaissie, E., Epstein, J., *et al.* (2001). Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood* 98, 492-494.
- Barreto-Andrade, J. C., Efimova, E. V., Mauceri, H. J., Beckett, M. A., Sutton, H. G., Darga, T. E., Vokes, E. E., Posner, M. C., Kron, S. J., and Weichselbaum, R. R. (2011). Response of human prostate cancer cells and tumors to combining PARP inhibition with ionizing radiation. *Mol Cancer Ther* 10, 1185-1193.
- Bartlett, J. B., Dredge, K., and Dalglish, A. G. (2004). The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 4, 314-322.

- Berrieman, H. K., Lind, M. J., and Cawkwell, L. (2004). Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *The Lancet Oncology* 5, 158-164.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1295-1302.
- Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J., and Timms, B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101, 2371-2490.
- Bui, M., and Reiter, R. E. (1998). Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 17, 391-399.
- Cabrespine, A., Guy, L., Khenifar, E., Cure, H., Fleury, J., Penault-Llorca, F., Kwiatkowski, F., Barthomeuf, C., Chollet, P., and Bay, J. O. (2006). Randomized Phase II study comparing paclitaxel and carboplatin versus mitoxantrone in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Urology* 67, 354-359.
- Carlson, B. A., Dubay, M. M., Sausville, E. A., Brizuela, L., and Worland, P. J. (1996). Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 56, 2973-2978.
- Cartee, L., Wang, Z., Decker, R. H., Chellappan, S. P., Fusaro, G., Hirsch, K. G., Sankala, H. M., Dent, P., and Grant, S. (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) flavopiridol disrupts phorbol 12-myristate 13-acetate-induced differentiation and CDKI expression while enhancing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cancer research* 61, 2583-2591.
- Castro, E., and Eeles, R. (2012). The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian J Androl* 14, 409-414.
- Clark, J., Merson, S., Jhavar, S., Flohr, P., Edwards, S., Foster, C. S., Eeles, R., Martin, F. L., Phillips, D. H., Crundwell, M., *et al.* (2007). Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26, 2667-2673.
- Coleman, R. E., Major, P., Lipton, A., Brown, J. E., Lee, K. A., Smith, M., Saad, F., Zheng, M., Hei, Y. J., Seaman, J., and Cook, R. (2005). Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 4925-4935.
- Corral, L. G., Haslett, P. A., Muller, G. W., Chen, R., Wong, L. M., Ocampo, C. J., Patterson, R. T., Stirling, D. I., and Kaplan, G. (1999). Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 163, 380-386.
- Corral, L. G., and Kaplan, G. (1999). Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1, I107-113.

- Cheetham, P. J., and Katz, A. E. (2011). Diet and prostate cancer - a holistic approach to management. *Arch Esp Urol* *64*, 720-734.
- Chen, C. D., Welsbie, D. S., Tran, C., Baek, S. H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M. G., and Sawyers, C. L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* *10*, 33-39.
- Chen, Y. M., Shih, J. F., Lee, C. S., Chen, M. C., Lin, W. C., Tsai, C. M., and Perng, R. P. (2003). Phase II study of docetaxel and ifosfamide combination chemotherapy in non-small-cell lung cancer patients failing previous chemotherapy with or without paclitaxel. *Lung Cancer* *39*, 209-214.
- D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., and Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4082-4085.
- De Luca, P., Vazquez, E. S., Moiola, C. P., Zalazar, F., Cotignola, J., Gueron, G., Gardner, K., and De Siervi, A. (2011). BRCA1 loss induces GADD153-mediated doxorubicin resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Res* *9*, 1078-1090.
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., and Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* *7*, 256-269.
- de Murcia, J. M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F. J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., *et al.* (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 7303-7307.
- Debes, J. D., and Tindall, D. J. (2002). The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett* *187*, 1-7.
- Dobzhansky, T. (1946). *Genetics of Natural Populations*. Xiii. Recombination and Variability in Populations of *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics* *31*, 269-290.
- Douglas, J. A., Levin, A. M., Zuhlke, K. A., Ray, A. M., Johnson, G. R., Lange, E. M., Wood, D. P., and Cooney, K. A. (2007). Common variation in the BRCA1 gene and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *16*, 1510-1516.
- Drees, M., Dengler, W. A., Roth, T., Labonte, H., Mayo, J., Malspeis, L., Grever, M., Sausville, E. A., and Fiebig, H. H. (1997). Flavopiridol (L86-8275): selective antitumor activity in vitro and activity in vivo for prostate carcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *3*, 273-279.
- Du, Z., Fujiyama, C., Chen, Y., and Masaki, Z. (2003). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in human normal, benign, and malignant prostate tissue. *Chin Med J (Engl)* *116*, 1936-1939.
- Duque, J. L., Loughlin, K. R., Adam, R. M., Kantoff, P. W., Zurakowski, D., and Freeman, M. R. (1999). Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* *54*, 523-527.

- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* *434*, 917-921.
- Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 34-45.
- Figg, W. D., Dahut, W., Duray, P., Hamilton, M., Tompkins, A., Steinberg, S. M., Jones, E., Premkumar, A., Linehan, W. M., Floeter, M. K., *et al.* (2001). A randomized phase II trial of thalidomide, an angiogenesis inhibitor, in patients with androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* *7*, 1888-1893.
- Figg, W. D., Li, H., Sissung, T., Retter, A., Wu, S., Gulley, J. L., Arlen, P., Wright, J. J., Parnes, H., Fedenko, K., *et al.* (2007). Pre-clinical and clinical evaluation of estramustine, docetaxel and thalidomide combination in androgen-independent prostate cancer. *BJU international* *99*, 1047-1055.
- Fine, H. A., Figg, W. D., Jaeckle, K., Wen, P. Y., Kyritsis, A. P., Loeffler, J. S., Levin, V. A., Black, P. M., Kaplan, R., Pluda, J. M., and Yung, W. K. (2000). Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol* *18*, 708-715.
- Fong, P. C., Boss, D. S., Yap, T. A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., and O'Connor, M. J. (2009). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *New England Journal of Medicine* *361*, 123-134.
- Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A., and Goldgar, D. E. (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* *343*, 692-695.
- Gallagher, D. J., Gaudet, M. M., Pal, P., Kirchhoff, T., Balistreri, L., Vora, K., Bhatia, J., Stadler, Z., Fine, S. W., Reuter, V., *et al.* (2010). Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer. *Clin Cancer Res* *16*, 2115-2121.
- Ge, Y., Byun, J. S., De Luca, P., Gueron, G., Yabe, I. M., Sadiq-Ali, S. G., Figg, W. D., Quintero, J., Haggerty, C. M., Li, Q. Q., *et al.* (2008). Combinatorial antileukemic disruption of oxidative homeostasis and mitochondrial stability by the redox reactive thalidomide 2-(2,4-difluoro-phenyl)-4,5,6,7-tetrafluoro-1H-isoindole-1,3(2H)-dione (CPS49) and flavopiridol. *Mol Pharmacol* *74*, 872-883.
- Ge, Y., Montano, I., Rustici, G., Freebern, W. J., Haggerty, C. M., Cui, W., Ponciano-Jackson, D., Chandramouli, G. V., Gardner, E. R., Figg, W. D., *et al.* (2006). Selective leukemic-cell killing by a novel functional class of thalidomide analogs. *Blood* *108*, 4126-4135.
- Gomez, L. A., de Las Pozas, A., and Perez-Stable, C. (2006). Sequential combination of flavopiridol and docetaxel reduces the levels of X-linked inhibitor of apoptosis and AKT



proteins and stimulates apoptosis in human LNCaP prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 5, 1216-1226.

Gudmundsdottir, K., and Ashworth, A. (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 25, 5864-5874.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harik, L. R., and O'Toole, K. M. (2012). Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder. *Arch Pathol Lab Med* 136, 721-734.

Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., and Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 4, 806-813.

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.

Hsing, A. W., and Chokkalingam, A. P. (2006). Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci* 11, 1388-1413.

Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., and O'Leary, J. (2005). Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 58, 673-684.

Issbrucker, K., Marti, H. H., Hippenstiel, S., Springmann, G., Voswinckel, R., Gaumann, A., Breier, G., Drexler, H. C., Suttorp, N., and Clauss, M. (2003). p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 262-264.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*.

Jeske, S., Tagawa, S. T., Olowokure, O., Selzer, J., Giannakakou, P., and Nanus, D. M. (2011). Carboplatin plus paclitaxel therapy after docetaxel in men with metastatic castrate resistant prostate cancer. *Urol Oncol* 29, 676-681.

Jiao, W., Lin, H. M., Datta, J., Braunschweig, T., Chung, J. Y., Hewitt, S. M., and Rane, S. G. (2008). Aberrant nucleocytoplasmic localization of the retinoblastoma tumor suppressor protein in human cancer correlates with moderate/poor tumor differentiation. *Oncogene* 27, 3156-3164.

Johnson, D. G., and Walker, C. L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 295-312.

Kitada, S., Zapata, J. M., Andreeff, M., and Reed, J. C. (2000). Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 96, 393-397.

Kluetz, P. G., Figg, W. D., and Dahut, W. L. (2010). Angiogenesis inhibitors in the treatment of prostate cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy* 11, 233-247.

Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T., and Kallioniemi, O. P. (1997). Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 57, 314-319.

Koumenis, C., and Giaccia, A. (1997). Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* 17, 7306-7316.

Kyle, A. H., Huxham, L. A., Yeoman, D. M., and Minchinton, A. I. (2007). Limited tissue penetration of taxanes: a mechanism for resistance in solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2804-2810.

Lam, L. T., Pickeral, O. K., Peng, A. C., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Giltane, J. M., Averett, L. M., Zhao, H., Davis, R. E., Sathymoorthy, M., *et al.* (2001). Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2, RESEARCH0041.

Lenz, W., and Knapp, K. (1962). Thalidomide embryopathy. *Archives of environmental health* 5, 100-105.

Leo, S., Accettura, C., and Lorusso, V. (2011). Castration-resistant prostate cancer: targeted therapies. *Chemotherapy* 57, 115-127.

Leongamornlert, D., Mahmud, N., Tymrakiewicz, M., Saunders, E., Dadaev, T., Castro, E., Goh, C., Govindasami, K., Guy, M., O'Brien, L., *et al.* (2012). Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer* 106, 1697-1701.

Little, R. F., Wyvill, K. M., Pluda, J. M., Welles, L., Marshall, V., Figg, W. D., Newcomb, F. M., Tosato, G., Feigal, E., Steinberg, S. M., *et al.* (2000). Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 18, 2593-2602.

Liu, A. Y., True, L. D., LaTray, L., Nelson, P. S., Ellis, W. J., Vessella, R. L., Lange, P. H., Hood, L., and van den Engh, G. (1997). Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10705-10710.

Liu, G., Gandara, D. R., Lara, P. N., Jr., Raghavan, D., Doroshow, J. H., Twardowski, P., Kantoff, P., Oh, W., Kim, K., and Wilding, G. (2004). A Phase II trial of flavopiridol (NSC #649890) in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10, 924-928.

Losiewicz, M. D., Carlson, B. A., Kaur, G., Sausville, E. A., and Worland, P. J. (1994). Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Commun* 201, 589-595.

Lu, X., Burgan, W. E., Cerra, M. A., Chuang, E. Y., Tsai, M. H., Tofilon, P. J., and Camphausen, K. (2004). Transcriptional signature of flavopiridol-induced tumor cell death. *Molecular cancer therapeutics* 3, 861-872.

Manfredi, J. J., and Horwitz, S. B. (1984). Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacology & therapeutics* 25, 83-125.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.

Moiola, C., De Luca, P., Cotignola, J., Gardner, K., Vazquez, E., and De Siervi, A. (2012). Dynamic coregulatory complex containing BRCA1, E2F1 and CtIP controls ATM transcription. *Cell Physiol Biochem* 30, 596-608.

Mostaghel, E. A., Page, S. T., Lin, D. W., Fazli, L., Coleman, I. M., True, L. D., Knudsen, B., Hess, D. L., Nelson, C. C., Matsumoto, A. M., et al. (2007). Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer. *Cancer research* 67, 5033-5041.

Motwani, M., Rizzo, C., Sirotnak, F., She, Y., and Schwartz, G. K. (2003). Flavopiridol enhances the effect of docetaxel in vitro and in vivo in human gastric cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 2, 549-555.

Nelson, W. G., De Marzo, A. M., and Isaacs, W. B. (2003). Prostate cancer. *N Engl J Med* 349, 366-381.

Ng, S. S., Gutschow, M., Weiss, M., Hauschildt, S., Teubert, U., Hecker, T. K., Luzzio, F. A., Kruger, E. A., Eger, K., and Figg, W. D. (2003). Antiangiogenic activity of N-substituted and tetrafluorinated thalidomide analogues. *Cancer research* 63, 3189-3194.

Ng, S. S., MacPherson, G. R., Gutschow, M., Eger, K., and Figg, W. D. (2004). Antitumor effects of thalidomide analogs in human prostate cancer xenografts implanted in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 10, 4192-4197.

Oelgeschlager, T. (2002). Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *Journal of cellular physiology* 190, 160-169.

Otto, H., Reche, P. A., Bazan, F., Dittmar, K., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2005). In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC genomics* 6, 139.

Paller, C. J., and Antonarakis, E. S. (2011). Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug design, development and therapy* 5, 117-124.

Park, J. J., Irvine, R. A., Buchanan, G., Koh, S. S., Park, J. M., Tilley, W. D., Stallcup, M. R., Press, M. F., and Coetzee, G. A. (2000). Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor. *Cancer Res* 60, 5946-5949.

Petrylak, D. P., Tangen, C. M., Hussain, M. H., Lara, P. N., Jr., Jones, J. A., Taplin, M. E., Burch, P. A., Berry, D., Moinpour, C., Kohli, M., et al. (2004). Docetaxel and

estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *The New England journal of medicine* 351, 1513-1520.

Pienta, K. J., and Bradley, D. (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1665-1671.

Price, D. K., Ando, Y., Kruger, E. A., Weiss, M., and Figg, W. D. (2002). 5'-OH-thalidomide, a metabolite of thalidomide, inhibits angiogenesis. *Therapeutic drug monitoring* 24, 104-110.

Quinn, J. E., Kennedy, R. D., Mullan, P. B., Gilmore, P. M., Carty, M., Johnston, P. G., and Harkin, D. P. (2003). BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 63, 6221-6228.

Raje, N., and Anderson, K. C. (2002). Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. *Current opinion in oncology* 14, 635-640.

Rajkumar, S. V., Fonseca, R., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Witzig, T. E., Kyle, R. A., Gertz, M. A., and Greipp, P. R. (2000). Thalidomide in the treatment of relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 75, 897-901.

Reynolds, M. A. (2008). Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett* 271, 13-24.

Rottenberg, S., Nygren, A. O., Pajic, M., van Leeuwen, F. W., van der Heijden, I., van de Wetering, K., Liu, X., de Visser, K. E., Gilhuijs, K. G., van Tellingen, O., *et al.* (2007). Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12117-12122.

Rowinsky, E. K., Smith, L., Wang, Y. M., Chaturvedi, P., Villalona, M., Campbell, E., Aylesworth, C., Eckhardt, S. G., Hammond, L., Kraynak, M., *et al.* (1998). Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel in combination with biricodar, a novel agent that reverses multidrug resistance conferred by overexpression of both MDR1 and MRP. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16, 2964-2976.

Saad, F., McKiernan, J., and Eastham, J. (2006). Rationale for zoledronic acid therapy in men with hormone-sensitive prostate cancer with or without bone metastasis. *Urologic oncology* 24, 4-12.

Sampson, N., Untergasser, G., Plas, E., and Berger, P. (2007). The ageing male reproductive tract. *J Pathol* 211, 206-218.

Scardino, P. T., Weaver, R., and Hudson, M. A. (1992). Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol* 23, 211-222.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 517-528.

Schulz, W. A., Burchardt, M., and Cronauer, M. V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9, 437-448.

Schwartz, G. K., O'Reilly, E., Ilson, D., Saltz, L., Sharma, S., Tong, W., Maslak, P., Stoltz, M., Eden, L., Perkins, P., *et al.* (2002). Phase I study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in combination with paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20, 2157-2170.

Schwartz, G. K., and Shah, M. A. (2005). Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 9408-9421.

Sella, A., Yarom, N., Zisman, A., and Kovel, S. (2009). Paclitaxel, estramustine and carboplatin combination chemotherapy after initial docetaxel-based chemotherapy in castration-resistant prostate cancer. *Oncology* 76, 442-446.

Senderowicz, A. M. (2003). Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene* 22, 6609-6620.

Senra, J. M., Telfer, B. A., Cherry, K. E., McCrudden, C. M., Hirst, D. G., O'Connor, M. J., Wedge, S. R., and Stratford, I. J. (2011). Inhibition of PARP-1 by olaparib (AZD2281) increases the radiosensitivity of a lung tumor xenograft. *Molecular cancer therapeutics* 10, 1949-1958.

Shand, R. L., and Gelmann, E. P. (2006). Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol* 16, 123-131.

Shortt, J., Hsu, A. K., and Johnstone, R. W. (2013). Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. *Oncogene* 32, 4191-4202.

Snyder, J. P., Nettles, J. H., Cornett, B., Downing, K. H., and Nogales, E. (2001). The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5312-5316.

Sun, S., Sprenger, C. C., Vessella, R. L., Haugk, K., Soriano, K., Mostaghel, E. A., Page, S. T., Coleman, I. M., Nguyen, H. M., Sun, H., *et al.* (2010). Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *The Journal of clinical investigation* 120, 2715-2730.

Taguchi, T., Aihara, T., Takatsuka, Y., Shin, E., Motomura, K., Inaji, H., Noguchi, S., and Kinki Breast Cancer Study, G. (2004). Phase II study of weekly paclitaxel for docetaxel-resistant metastatic breast cancer in Japan. *The breast journal* 10, 509-513.

Taichman, R. S., Loberg, R. D., Mehra, R., and Pienta, K. J. (2007). The evolving biology and treatment of prostate cancer. *J Clin Invest* 117, 2351-2361.

- Takeda, M., Mizokami, A., Mamiya, K., Li, Y. Q., Zhang, J., Keller, E. T., and Namiki, M. (2007). The establishment of two paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines. *The Prostate* 67, 955-967.
- Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., Oudard, S., Theodore, C., James, N. D., Turesson, I., *et al.* (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351, 1502-1512.
- Taplin, M. E., Bubley, G. J., Shuster, T. D., Frantz, M. E., Spooner, A. E., Ogata, G. K., Keer, H. N., and Balk, S. P. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332, 1393-1398.
- Tohnya, T. M., Hwang, K., Lepper, E. R., Fine, H. A., Dahut, W. L., Venitz, J., Sparreboom, A., and Figg, W. D. (2004a). Determination of CC-5013, an analogue of thalidomide, in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 811, 135-141.
- Tohnya, T. M., Ng, S. S., Dahut, W. L., Wright, J. J., Arlen, P. M., Gulley, J. L., Parker, C., Zeldis, J., and Figg, W. D. (2004b). A phase I study of oral CC-5013 (lenalidomide, Revlimid), a thalidomide derivative, in patients with refractory metastatic cancer. *Clinical prostate cancer* 2, 241-243.
- Trimble, E. L., Adams, J. D., Vena, D., Hawkins, M. J., Friedman, M. A., Fisherman, J. S., Christian, M. C., Canetta, R., Onetto, N., Hayn, R., and *et al.* (1993). Paclitaxel for platinum-refractory ovarian cancer: results from the first 1,000 patients registered to National Cancer Institute Treatment Referral Center 9103. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 11, 2405-2410.
- Tulinius, H., Egilsson, V., Olafsdottir, G. H., and Sigvaldason, H. (1992). Risk of prostate, ovarian, and endometrial cancer among relatives of women with breast cancer. *Bmj* 305, 855-857.
- Tutt, A., and Ashworth, A. (2002). The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends in molecular medicine* 8, 571-576.
- Tutt, A., Robson, M., Garber, J., Domchek, S., Audeh, M., Weitzel, J., Friedlander, M., and Carmichael, J. (2009). Phase II trial of the oral PARP inhibitor olaparib in BRCA-deficient advanced breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27.
- Underhill, C., Toulmonde, M., and Bonnefoi, H. (2011). A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22, 268-279.
- Valero, V., Jones, S. E., Von Hoff, D. D., Booser, D. J., Mennel, R. G., Ravdin, P. M., Holmes, F. A., Rahman, Z., Schottstaedt, M. W., Erban, J. K., *et al.* (1998). A phase II study of docetaxel in patients with paclitaxel-resistant metastatic breast cancer. *Journal*

of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 16, 3362-3368.

Verweij, J., Clavel, M., and Chevalier, B. (1994). Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): not simply two of a kind. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 5, 495-505.

Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., and Cunha, G. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 68, 270-279.

Wang, Z. Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K., and Wagner, E. F. (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes & development* 11, 2347-2358.

Warfel, N. A., Lepper, E. R., Zhang, C., Figg, W. D., and Dennis, P. A. (2006). Importance of the stress kinase p38alpha in mediating the direct cytotoxic effects of the thalidomide analogue, CPS49, in cancer cells and endothelial cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 3502-3509.

Weidner, N., Carroll, P. R., Flax, J., Blumenfeld, W., and Folkman, J. (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *The American journal of pathology* 143, 401-409.

Yared, J. A., and Tkaczuk, K. H. (2012). Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug design, development and therapy* 6, 371-384.

Yeh, S., Hu, Y. C., Rahman, M., Lin, H. K., Hsu, C. L., Ting, H. J., Kang, H. Y., and Chang, C. (2000). Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11256-11261.

Yoshida, K., and Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95, 866-871.

Zander, S. A., Kersbergen, A., van der Burg, E., de Water, N., van Tellingen, O., Gunnarsdottir, S., Jaspers, J. E., Pajic, M., Nygren, A. O., Jonkers, J., *et al.* (2010). Sensitivity and acquired resistance of BRCA1;p53-deficient mouse mammary tumors to the topoisomerase I inhibitor topotecan. *Cancer Res* 70, 1700-1710.