

TRATAMIENTO Y POST-TRATAMIENTO CON LONIDAMINA EN LA LINEA CELULAR DE CARCINOMA COLONICO HUMANO HT-29

ALICIA G. FUCHS

*Centro de Altos Estudios en Ciencias de la Salud (CAECIS), Universidad Abierta Interamericana (UAI)
Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CIBIERG), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Resumen Lonidamina (1-[2,4-diclorofenil metil]-1H indazol-3-ácido carboxílico), (Ind), es una droga antineoplásica cuyo mecanismo de acción se ejerce sobre el metabolismo intermedio de la glucosa. Los efectos de la Ind sobre el crecimiento celular y el metabolismo celular se investigaron en las células HT-29, línea celular de carcinoma colónico humano, que requiere altas concentraciones de glucosa para su crecimiento indiferenciado en cultivo. La Ind en dosis de 0.2 mM disminuyó significativamente el crecimiento celular y la formación de colonias en agar; con la interrupción del tratamiento se observó el restablecimiento del crecimiento celular en 24 horas. El tratamiento con Ind produce la redistribución de los glicoconjugados y el receptor de la manosa, sin afectar en forma drástica la síntesis de glucógeno ni la de proteínas. Estas posiblemente sean las causas de la rápida reversibilidad del tratamiento.

Palabras clave: carcinoma de colon, lonidamina, crecimiento celular

Abstract *Treatment and post-treatment with lonidamine in human colon carcinoma HT-29 cell line.*

Lonidamine (1-[2,4-dichlorophenyl methyl]-1H indazole-3-carboxylic acid), Ind, is an antitumoral drug acting on mitochondria and glucose metabolism. Cell growth and metabolic effects of Ind and drug post-treatment effect were investigated in undifferentiated HT-29 human colonic carcinoma cell line which requires high glucose medium concentration for growth. 0.2 mM Ind significantly decreased cell spreading and growth in monolayer or agar cell culture. After drug treatment cell growth was reestablished to control value within 24 h. Ind modified glycoconjugates and mannose-receptor distribution (analyzed by confocal microscopy), while glucose-glycogen and protein synthesis were not affected, these being the possible reasons for the fast reversible effect.

Key words: colonic carcinoma, lonidamine, cell growth

Se sabe que las células que sufren transformación neoplásica pierden la regulación metabólica existente entre la glucólisis y la respiración celular¹. Estas células se caracterizan por una elevada tasa glucolítica, que incluye el aumento de la expresión de la isoforma de la hexoquinasa mitocondrial². La carencia de glucosa disminuye la viabilidad celular y su falta es determinante para el comienzo del proceso de muerte celular programada³. Una de las enzimas involucradas en este proceso de muerte sería la hexoquinasa II, frecuentemente más expresada en las células tumorales con fenotipo altamente glucolítico. La hexoquinasa II favorece la producción de ATP en condiciones de hipoxia celular y este sería el mecanismo involucrado en la inmortalización de las poblaciones celulares alejadas de los vasos sanguíneos⁴.

La línea celular HT-29 es originaria de un adenocarcinoma de colon humano^{5,6}, que tiene como característica la de diferenciarse a células epiteliales intestinales embrionarias cuando la glucosa es removida del medio de cultivo o reemplazada por la inosina⁷. En la línea celular HT-29, Denis-Pouxviel y col.⁸ observaron que la presencia de glucosa en el medio de cultivo determinaba que las células permanezcan indiferenciadas, presentando desacoplamiento entre la actividad hexoquinasa y la fosforilación oxidativa.

La Ind es un antineoplásico de síntesis derivado del ácido indazol-3-carboxílico, que interfiere con la función de la hexoquinasa unida a la mitocondria^{9,10}, afectando la respiración celular y la diferencia de potencial transmembrana mitocondrial¹¹. Recientemente se han identificados como blancos de la Ind en la mitocondria el poro de permeabilidad transitoria (PT) y el translocador del nucleótido de la adenina (ANT)^{12,13}. La Ind se estudió como droga antineoplásica en investigaciones preclínicas asociada con el cisplatino¹⁴, doxorubicina o ciclofosfamida¹⁵. También se han iniciado investigacio-

Recibido: 26-XII-2006

Aceptado: 31-VIII-2007

Dirección postal: Dra. Alicia G. Fuchs, Universidad Abierta Interamericana, CAECIS, Montes de Oca 745, 1270 Buenos Aires, Argentina
Fax : (54-11) 4301-5240 e-mail: alicia.fuchs@vaneduc.edu.ar

nes clínicas fases II y I para cánceres de mama¹⁶ y de ovario¹⁷.

Uno de los aspectos poco estudiados en relación a la Ind es su efecto sobre los glicoconjugados celulares. Los glicoconjugados tienen funciones relacionadas con la proliferación, el reconocimiento y la diferenciación celular¹⁸. Las células HT-29 en medio de cultivo privado de glucosa se diferencian, cambiando en forma concomitante los patrones de glicosilación proteica. En las células indiferenciadas se observó un aumento de la acumulación de glicoproteínas ricas en manosa en los lisosomas^{19, 20}. Un aspecto relacionado con los glicoconjugados es la expresión de los receptores de la manosa (MR). En las células tumorales se observó que la expresión de los MR está inversamente correlacionada con el grado de malignidad tumoral²¹. Los MR tienen como función la de reconocer e interiorizar las enzimas glicosiladas lisosomales y las glicoproteínas o glicopéptidos que presentan residuos terminales de manosa, fucosa o N-acetilglucosamina, liberando el ligando a pH ácido en los endosomas celulares, por lo que su rol estaría relacionado con el reciclaje de receptores y de glicoproteínas.

En este trabajo se investigaron los efectos de la Ind sobre la línea celular HT-29 indiferenciada, cultivada con alta concentración de glucosa. Se investigó el efecto de la Ind sobre el crecimiento celular y su efecto residual después de la remoción de la droga. Además, se investigaron aspectos relacionados con el metabolismo de la glucosa, proteínas y glicoconjugados, con la finalidad de conocer si estos factores estarían involucrados en la rápida reversibilidad del tratamiento.

Materiales y métodos

El origen de los materiales químicos es el siguiente, desde *Sigma, Chemical Co*, St Louis, MO, EE.UU. se obtuvo el rojo neutro que se utilizó para el estudio de la toxicidad. También son de *Sigma* el dodecil sulfato de sodio (sds) para la solubilización de ADN y ARN y el kit para la determinación de lactato (*Sigma-Diagnostica 826. UV*). Además, el ácido fosfotúngstico, el triton x-100, los glúcidos 1-O-metil- α -D-glucopiranosida, α -metil-D-nanosida, utilizados para demostrar la afinidad específica de las glicoproteínas a la lectina concavalina-A (con-A), fueron obtenidos de *Sigma*. Para la microscopía confocal se utilizó el anticuerpo anti-con-A-rodamina de *Sigma*. Las neoglicoproteínas para microscopía confocal utilizadas fueron la fluoresceína-bsa-manosa y scon-A, el *Cytochem* se utilizó para montar las muestras y la acrilamida bis-acrilamida gel para electroforesis para proteínas, también se obtuvieron de *Sigma*. De *Amersham Radiochemical Center*, G. Bretaña, se obtuvieron los radioactivos [5-3H] timidina, [5-3H] uridina, L-[U-14C] leucina, [2-3H] manosa para los estudios metabólicos celulares y de *Chromatography Millipore*, EE.UU. provino la carboximetil celulosa, cm52 para la separación de proteínas y de *Pharmacia Biotech*, Suecia, se obtuvo para la cromatografía de afinidad la con-A sefarosa. De *Calbiochem*, Francia, se obtuvo la pronasa grado CB 2 mg/ml para la digestión de las glicoproteínas. De *Pierce Chemical Co*, EE.UU., se obtuvo el reactivo de Bradford para la

cuantificación de proteínas. La Ionidamina (1-[2,4-diclorofenil metil]-1H indazol-3-ácido caboxílico), (Ind), fue gentilmente donada por el Dr. A. Floridi, del Instituto Regina Elena, Roma, Italia.

Cultivo celular

Las células HT-29, provenientes de un adenocarcinoma colónico humano se cultivaron como fue descrito con anterioridad¹⁹. Brevemente, las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco sin glucosa (*Eurobio*) suplementado con 10% de suero fetal bovino dializado (Bohinger), 25 mM de glucosa, 2.5 mM de inosina, 1% de penicilina/estreptomocina (*Eurobio*), en frascos de cultivo tipo Falcon de 75 mm. Cuando las células llegaron al 70% de confluencia se despegaron con tripsina-EDTA (*Eurobio*) y la suspensión celular se diluyó.

Establecimiento de la concentración de Ind para el tratamiento

La concentración de Ind necesaria para el tratamiento en cultivo de las células HT-29 indiferenciadas, se estableció por el método de evaluación de toxicidad utilizando el rojo neutro. Las células HT-29 indiferenciadas se cultivaron hasta 60-70% de confluencia en placas de 24 pocillos. La solución stock de Ind se preparó en dimetilsulfóxido (dmsó) a una concentración 33.33 mM. La Ind se adicionó, en muestras por triplicado, al medio de cultivo a una concentración de 0.1; 0.2 y 0.4 mM y el dmsó 0.3; 0.6 y 1.2% (v/v). La incubación se realizó durante 24 horas, luego se extrajo el medio con droga y las células se incubaron 3 h adicionales con el rojo neutro²²; al término de la incubación el medio se aspiró y la monocapa celular se fijó con 1% ácido acético/50% etanol (v/v). El rojo neutro intracelular se midió con un espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda.

Estudios del efecto de la Ind sobre el crecimiento celular

a) Las células HT-29 se cultivaron en platos de 96 pocillos a una concentración de 2×10^2 células por pocillo. Luego de 24 h de cultivo, las monocapas se lavaron con *buffer* fosfatosalino y se adicionó Ind 0.2 mM (tratadas), 0.6% dmsó (control) o medio de cultivo (estándar). El crecimiento celular se estudió mediante el conteo de las células vivas por el método de exclusión del azul de tripán. b) La formación de colonias celulares en agar se realizó sembrando las células en placas de 24 pocillos que contenían una mezcla 1:1 (v/v) de agar 3.5%, preparado en agua bidestilada (p/v) y medio (sin glucosa) suplementado con 50 mM de glucosa, 5 mM de inosina, 2% penicilina/estreptomocina y 20% de suero fetal bovino dializado. La Ind, 0.2 mM y 0.6% dmsó (v/v) o medio de cultivo se adicionaron a la mezcla de medio/agar. Posteriormente se agregó una dispersión monocelular de 10^2 células por pocillo. Después de 24 h de incubación se colocó en cada pocillo 1 ml de medio de cultivo conteniendo 0.2 mM de Ind; 0.6% dmsó (v/v) o medio de cultivo. Las células se incubaron durante 10 días y en el décimo se fijaron con formaldehído neutro para proceder al conteo de las colonias formadas, utilizando un microscopio estereoscópico a una magnificación de 100 aumentos (*Zeiss ICM 405*). Se consideró colonia celular a grupos de 10 o más células.

El efecto de la Ind sobre la síntesis de ADN y de proteínas

Una suspensión 10^3 células/ml se sembró en placas de 24 pocillos. El tratamiento con 0.2 mM de Ind, 0.6% de dmsó (v/v) o medio de cultivo, comenzó 24 h después de la siembra.

a) La síntesis de ADN se investigó mediante la incorporación de timidina tritiada: $1 \mu\text{Ci}$ [^3H] timidina, (17 Ci/mmol) al ADN. La [^3H] timidina se adicionó al medio de cultivo de cada pocillo en los días 3^o, 5^o y 7^o después de la siembra. La marcaación se realizó durante 2 h, luego las células se lavaron con *buffer* fosfato frío tres veces, dos veces con ácido tricloroacético (TCA) 5% y luego se incubaron 30 min a 37 °C con TCA 5%, para eliminar las proteínas celulares. El ADN se extrajo con 0.1 M de HONa / 0.1% de sds (v:v) en solución acuosa. En paralelo, otras muestras tratadas con lnd o dmsó sin marcación se tripsinizaron y las células vivas de la suspensión celular se contaron. La incorporación de [^3H] timidina en el ADN se estandarizó teniendo en cuenta la cantidad de células vivas. b) La síntesis de ARN se investigó marcando las células con $2 \mu\text{Ci}$ [^3H] uridina, (0.2 mCi/mmol), al 5^o día del cultivo durante 45 min. El ARN marcado se extrajo con 1 M de HONa. c) El estudio de la síntesis de proteínas se realizó al 5^o día de cultivo marcando la monocapa con $0.2 \mu\text{Ci}$ L-[^{14}C] leucina (142 Ci/mmol) en medio de cultivo sin leucina durante 45 min; las células se lavaron 3 veces con *buffer* fosfato frío y las proteínas se extrajeron con TCA 5% ácido fosfotúngstico 3% (v/v) incubando las muestras a 4 °C durante 30 min. d) La concentración de proteínas totales se midió en pocillos tratados en paralelo por el método Bradford²³.

Cromatografía de proteínas y SDS -PAGE

Las células tratadas con lnd, dmsó o medio de cultivo, como fue mencionado anteriormente, se tripsinizaron al día 5^o, el sedimento celular se lavó 2 veces con *buffer* fosfato-salino frío realizándose el tercer lavado con 50 mM tris-ClH, pH 7.5; 25 mM ClK; 5 mM Cl_2Ca y 250 mM sacarosa. Las células se homogeneizaron en forma mecánica en la misma solución con el agregado de 0.3% triton x-100, utilizando una aguja 25 G/8 y luego agitación magnética durante 48 h a 4 °C. El homogenato se centrifugó a 20 000 x g. El sobrenadante se dializó durante la primera noche contra agua bidestilada y durante la segunda noche contra de solución fosfato 100 mM pH 6.6 a 4 °C. Las proteínas se separaron de acuerdo al punto isoeléctrico en una columna de 1.50 x 8 cm de celulosa de intercambio catiónico, cm52, a una velocidad de 2 ml/min. La solución de elusión fue fosfato 100 mM pH 6.6, agregándose para la obtención de la segunda fracción ClNa 1 M. Los picos proteicos se siguieron a la longitud de onda 280 nm (*Beckman-DU64 espectrofotómetro*). Ambas fracciones se liofilizaron, se diluyeron con agua bidestilada y se dializaron durante toda la noche contra agua. Luego se les realizó una electroforesis en gel 15% acrilamida bis-acrilamida en condiciones desnaturizantes²⁴.

Entrada de glucosa a la célula, síntesis de glucógeno y liberación de ácido láctico

Las células HT-29 indiferenciadas se trataron como fue descrito anteriormente, en los días 3^o y 6^o después del sembrado se marcaron durante 45 min con $1 \mu\text{Ci}$ D-[^{14}C] glucosa (270 mCi/mmol) en medio. En los días de cultivo mencionados se investigó: a) Interiorización de la glucosa. Después de la incubación de las células con glucosa radioactiva, se lavaron con solución 20 mM tris pH 7.5 y luego se digirieron con 30% HOK durante 30 min a 37 °C. La radioactividad se midió en un contador de escintilación líquido (*MINAX5BTRICARB*[®]). b) Síntesis de glucógeno: las monocapas celulares se trataron como fue descrito en el punto a. Los residuos celulares se llevaron a ebullición en baño maría durante 2 h y en forma inmediata se congelaron. El glucógeno se obtuvo

luego de someter el material a 3 precipitaciones sucesivas con etanol 70%, la [^{14}C] glucosa incorporada en el glucógeno fue medida en el precipitado. El marcado radioactivo inespecífico se midió en muestras incubadas solamente 6 seg con glucosa radioactiva. c) El ácido láctico liberado por la célula se midió en el medio de cultivo en los días 3o y 6o. El medio de cultivo se centrifugó a 400 x g a 4 °C, durante 10 min, las proteínas se precipitaron con TCA 0.6 N y el lactato se midió a 340 nm según las indicaciones del método.

Estudio de los glicopéptidos

La síntesis y la distribución de glicopéptidos se realizó en monocapas celulares de 80-90% de confluencia, tratadas durante 24 h con 0.2 mM lnd, 0.6% dmsó o medio de cultivo. a) La síntesis de glicopéptidos se estudió marcando las células HT-29 con $120 \mu\text{Ci}$ de D-[^3H] manosa (13.6 Ci/mmol) durante 24 h. Luego, la monocapa celular se lavó con PBS conteniendo Ca^{++} Mg^{++} , se homogenizó mecánicamente y se extrajeron sucesivamente los lípidos con cloroformo-metanol (CM 2:1; v/v) y cloroformo-metanol-agua (CMW 10:10:3; v/v/v). Los glicopéptidos se obtuvieron después de la digestión de la fase acuosa con pronasa (60 °C)¹⁹, se cromatografiaron por una columna de con-A sefarosa, 0.5 x 1.5 cm, a una velocidad de 2 ml/min con una solución 25 mM tris-ClH pH 7.5, suplementada con 1 mM de Cl_2Ca , Cl_2Mg y 1 M de ClNa, luego se agregó a la solución de lavado 10 mM 1-O-metil- α -D-glucopiranosida y la elusión específica se realizó con 300 mM α -metil-D-mannosida. b) La distribución de las moléculas celulares afines a la con-A y a la manosa se estudiaron en microscopio confocal. Las células HT-29 se tripsinizaron, centrifugaron a 400 x g durante 10 min, las células viables se colocaron sobre cubreobjetos y se fijaron con formaldehído neutro al 4%, conteniendo Cl_2Ca 0.5 mM, el formaldehído se lavó con 0.1 M de solución de fosfato conteniendo Cl_2Ca 0.5 mM, Cl_2Mg , Cl_2Mn y 3.5% sacarosa a pH 7.4. Las células se permeabilizaron con triton x-100, 0.05% (v/v) en fosfato, y los restos de detergente se lavaron 5 veces con solución de fosfato. La fluorescencia inespecífica se bloqueó con CINH_2 . 50 mM. Luego, las células se incubaron por 2 h a 4 °C con 100 $\mu\text{g/ml}$ de con-A fría en tbs (tris-salina), se lavó el exceso con tbs- glucosa 20 mM, se incubaron las células 2 h más con 100 $\mu\text{g/ml}$ anti-con-A-rodamina; se eliminó el exceso de con-A y se incubaron nuevamente, esta vez con la fluoresceína-bsa-manosa, se lavó y se montaron las células marcadas con *Cytochem*. Los controles se realizaron con la incubación de la con-A en forma conjunta con 1 mg/ml bsa y la presencia de scon-A. La microscopía confocal láser se realizó con un *BioRad MRC-600*, montado a un microscopio *Nikon Optitop II* equipado con un objetivo 60 X (*Plano apo: NA 1,4*). Se usó un filtro *Kalman* durante la adquisición de imágenes (8 a 10 barridos). El registro de la doble fluorescencia en las imágenes se realizó en dos pasajes, el primero para la fluoresceína y el segundo para la rodamina²⁵. La evaluación semicuantitativa de las imágenes se realizó considerando los tipos de distribución de la fluorescencia hallada en el citoplasma celular, dispersa o condensada.

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de la varianza para la evaluación de los resultados²⁶. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos realizados en forma independiente y se expresan en media \pm sd (desvío estándar). Los controles y el grupo experimental se realizaron concomitantemente en cada ensayo; si no fue así se indica en el texto.

Resultados

Establecimiento de la concentración de Ind para el tratamiento

La concentración de Ind para el tratamiento de las células HT-29 indiferenciadas, se realizó con el método del rojo neutro, según se describe en materiales y métodos. Este método permite el estudio del daño de la membrana lisosomal. Se consideró que el valor normal de acumulación del colorante es el obtenido en las células incubadas solamente con medio de cultivo (100%). El tratamiento con Ind a concentraciones de 0.2 y 0.4 mM disminuyó la acumulación del rojo neutro en los lisosomas en un 18 y 28% respectivamente; con dmsa a concentraciones de 0.6 y 1.2% (v/v) se obtuvo una disminución de 3 y 16%. La concentración de 0.2 mM para la Ind fue la utilizada para la realización de los experimentos. Esta concentración de Ind corresponde al 0.6% (v/v) para el dmsa.

Estudios del efecto de la Ind sobre el crecimiento celular

El número de células HT-29 indiferenciadas tratadas, controles y estándares se contaron día por medio durante 1 semana, como se describe en materiales y métodos. La Fig. 1 muestra que la Ind disminuye la velocidad del

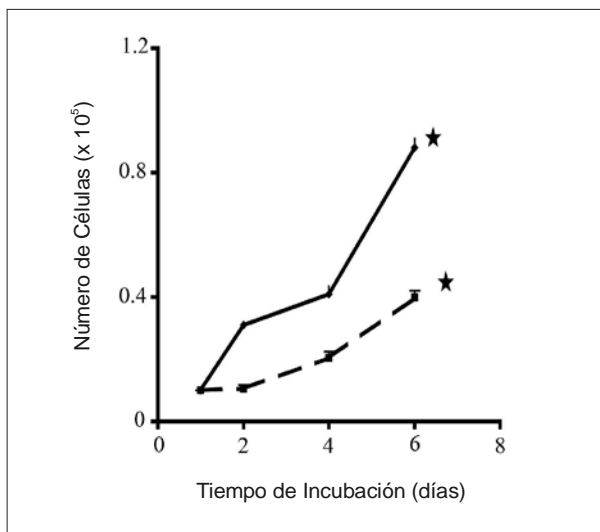


Fig 1.- Efecto de la Ind sobre el crecimiento de las células HT-29 indiferenciadas en cultivo. La cuantificación de células vivas se realizó por el método del azul tripán. Las células se trataron con 0.2 mM Ind disuelta en dmsa (línea punteada) y (línea sólida) control (dmsa 0.6%; v/v). Las células tratadas con Ind muestran una tasa de crecimiento lentificado * ($p < 0.01$) comparada con las células control. No se observaron ni más células muertas, ni en suspensión en el medio de cultivo, en el grupo tratado con Ind ($6 \pm 2\%$) comparadas con las células HT-29 control. Las muestras fueron evaluadas por triplicado.

crecimiento celular ($p < 0.01$). El tiempo de duplicación celular para el grupo tratado fue de 65 h mientras que para las células estándar y control fue 24 y 37 h respectivamente. El efecto de la Ind no se relaciona con un aumento de muerte celular, el método de azul de tripán evidenció el mismo porcentaje de células muertas en todos los grupos (5-10%). Sin embargo, hay que considerar que este método no evalúa el proceso de apoptosis celular en sus primeras etapas.

Para confirmar y explicar el resultado obtenido con la Ind sobre el crecimiento celular se realizó el ensayo de formación de colonias celulares en agar. Los resultados, obtenidos en 3 experimentos independientes, cada ensayo $n=10$ para cada grupo experimental, confirmaron el efecto observado anteriormente. El número de colonias desarrolladas fueron las siguientes (media \pm sd): 0.23 ± 0.56 para el tratado; el control 18.04 ± 3.61 y las células estándar 34.73 ± 9.78 colonias; la disminución de la cantidad de colonias celulares desarrolladas en presencia de Ind fue significativa ($p < 0.05$) comparada con el control y el estándar, sin observarse diferencias significativas entre estos dos últimos grupos.

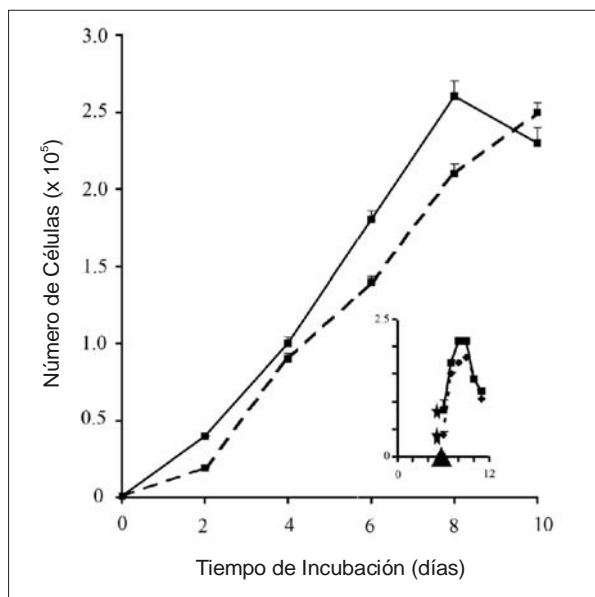


Fig 2.- Curva de crecimiento de células HT-29 indiferenciadas tratadas previamente con Ind. Las células se trataron con 0.2 mM Ind durante una semana, posteriormente se tripsinizaron, diluyeron y se cultivaron sin la adición de la droga. El crecimiento celular se evaluó por el test de viabilidad celular azul de tripán. Células HT-29 previamente tratadas, ex-Ind (línea punteada) presentan una misma tasa de crecimiento que las células nunca tratadas (línea sólida), células HT-29 estándar. En la figura insertada se observa a las células HT-29 creciendo con Ind hasta el 6° día (flecha) como se puede observar en la Figura 1, la Ind fue posteriormente removida, y se dejó a las células seguir creciendo en el mismo plato, las células recuperan la tasa de crecimiento de las células estándar en 24 h, después de la interrupción del tratamiento.

La duración del efecto de la Ind sobre el crecimiento celular, después de la terminación del tratamiento, mostró que las células retornan en 24 h a la tasa de crecimiento previa, o sea, la tasa de crecimiento de las células estándar (Fig. 2). Este resultado se confirmó en células tratadas previamente con Ind durante 1 semana y sembradas posteriormente en agar sin Ind que recobraron la cualidad de formar colonias, desarrollando 64.77 ± 16.86 colonias, $p \leq 0.001$, comparadas con células tratadas con Ind: 0.23 ± 0.15 . El grupo control desarrolló 17.12 ± 4.24 colonias.

Para investigar si el efecto de la Ind observado sobre el crecimiento celular podría ser debido a modificaciones producidas en el pegamiento y estiramiento de las células sobre el soporte, la Ind se agregó a la superficie de la placa de cultivo en el momento en que las células eran sembradas sobre ella. En la Fig. 3 se puede observar la formación de colonias celulares algodonosas después de 48 h de incubación de las células con la Ind (3A); células control y estándar (3B) muestran el patrón normal de pegamiento y estiramiento sobre soporte de la línea celular HT-29 indiferenciada.

El efecto de la Ind sobre la síntesis de ADN y de proteínas

El efecto de 0.2 mM de Ind sobre la síntesis de ADN y proteínas se estudió en 5 experimentos independientes ($n=15$ para los grupos experimentales tratadas, control y

estándar). a) La incorporación de $[5\text{-}^3\text{H}]$ timidina en el ADN celular normalizado por 10^4 células, muestra una incorporación en el grupo estándar de 1401.38 ± 176.38 cpm, en las células tratadas 425.69 ± 63.19 cpm y en el grupo control 1161.80 ± 149.30 cpm. La Ind disminuye la síntesis de ADN comparada con los grupos incubados con dms o medio de cultivo, $p \leq 0.05$.

b) La síntesis de proteínas y de ARN se estudió marcando las células con $[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]$ leucina para la síntesis de proteínas y la $[5\text{-}^3\text{H}]$ uridina para la síntesis de ARN. La Tabla 1 muestra que la razón leucina / uridina no tiene diferencias significativas entre los distintos grupos: tratadas, control y estándar. Aún más, la electroforesis de proteínas no mostró ninguna diferencia entre los grupos en la distribución de bandas (no se muestra el resultado).

Entrada de glucosa a la célula y síntesis de glucógeno

La Tabla 2 muestra el efecto del tratamiento de 0.2 mM Ind en la línea celular HT-29 indiferenciada en relación con algunos aspectos relacionados al metabolismo de la glucosa: su incorporación a la célula, su contribución a la síntesis de glucógeno y la secreción del ácido láctico. La Ind no altera en forma significativa ninguno de estos parámetros. Sin embargo, las células tratadas mostraron la mayor síntesis de glucógeno al 6° día de tratamiento ($48\ 010$ cpm), mientras que en las células contro-

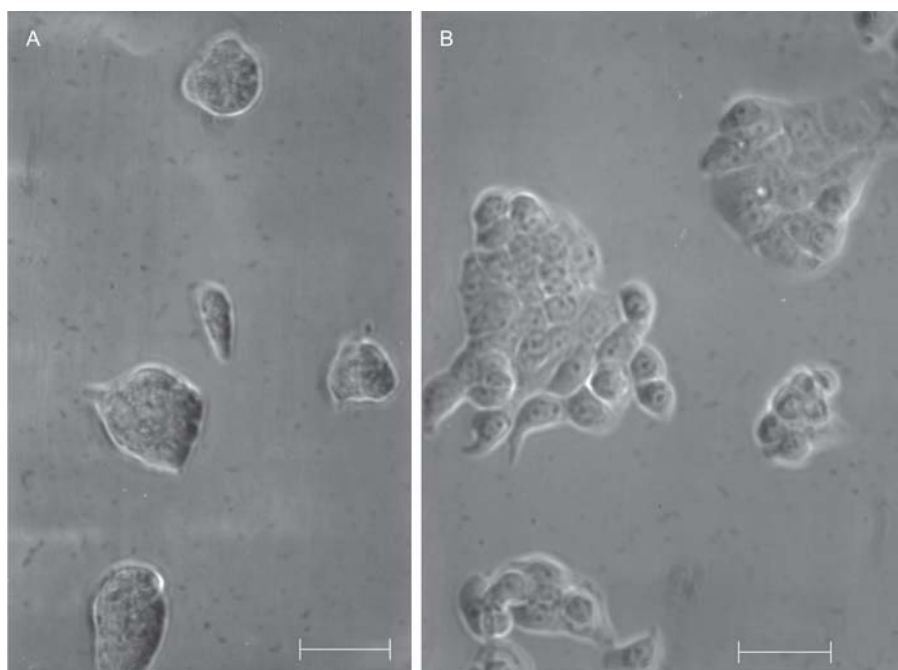


Fig 3.- Las células HT-29 indiferenciadas después de 48 h de cultivo. (A) Células tratadas con 0.2 mM Ind desde el momento del sembrado que muestran colonias más pequeñas, y algodonosas (B) Células tratadas con medio de cultivo, estándar, que muestran un patrón similar que las células controles (0.6% dms o) (no se muestra el dato). Observación realizada con microscopio de luz invertido, aumento de 100 campos, escala 20 μm .

TABLA 1.- Efecto de la Ind sobre la síntesis de ARN y proteínas

Grupos	ARN [U- ³ H]uridina cpm/μg prot. media ± sd	Proteína [D- ¹⁴ C] leucina cpm/μg prot media ± sd	Tasa [D- ¹⁴ C] leu. / [U- ³ H] uridina media ± sd	Total Proteínas μg media ± sd
Tratadas	1.22 ± 0,03	26.78 ± 1.75	21.95 ± 1.11	164.00 ± 1.77
Control	1.25 ± 0.02	30,53 ± 2.40	24.42 ± 1.70	180.74 ± 0.83
Estándar	1.46 ± 0,05	25.01 ± 2,90	17.13 ± 1.21	156.47 ± 2.17

Las células HT-29 indiferenciadas se trataron con 0.2 mM Ind (tratadas); células controles, son células con 0.6% dmsó y las células estándar son células con medio de cultivo solamente. Los valores se obtuvieron de 5 experimentos independientes (n=15). Las proteínas totales se midieron por el método de Bradford.

TABLA 2.- Efecto de la Ind sobre el metabolismo de la glucosa

Grupos	Lactato μmol/ mg proteína/ h media ± sd	Entrada de glucosa cpm/ mg proteína media ± sd	Glucógeno cpm media ± sd
Tratadas	0.58 ± 0.02	24 810 ± 2 660	48 010 ± 9 472
Control	0.59 ± 0.03	21 380 ± 2 740 *	37 489 ± 5 980
Estándar	0.60 ± 0.05	33 150 ± 3 760	44 525 ± 4 300

Las mediciones se efectuaron en 5 experimentos independientes. Las células tratadas son células incubadas con 0.2 mM Ind y se representan los valores al 6o día de tratamiento. El control son células incubadas con el vehículo, 0.6% dmsó, y estándar son las células incubadas con medio solamente. Los valores de los grupos control y estándar son los obtenidos al 4° día de cultivo. *p<0.01 comparado con las células estándar.

les y estándar la glucosa extracelular contribuye a la formación de glucógeno mayormente en el 4° día de cultivo. Las células tratadas con Ind mostraron al 4° día una incorporación de glucosa al glucógeno de sólo 13 770 cpm.

Estudio de los glicopéptidos

El estudio de la síntesis de glicopéptidos se realizó con D-³H] manosa. Una vez extraídos los glicopéptidos se separaron por afinidad a la con-A. Los glicopéptidos recuperados representaron el 36, 16 y 26% de la radioactividad total incorporada por la célula, considerando que las células tratadas incorporaron 347 000 cpm; las controles, 154 000 cpm y las estándar 251 000 cpm. Solamente las células incubadas con 0.6% de dmsó mostraron una incorporación menor de manosa radiactiva en los glicopéptidos (100-36%), respecto a las células tratadas con Ind y a las estándar. Los estudios realizados con microscopio confocal mostraron una distribución diferente de las moléculas celulares afines a la con-A y a la manosa respecto al grupo experimental. El 60% de las células tratadas con Ind presentan un patrón de distribución condensada en el citoplasma (Tabla 3), mientras que este patrón sólo está representado en un 18% de las células controles. El microscopio confocal (Fig. 4) visualiza las diferentes distribuciones de estas moléculas en las células tratadas con Ind (4A) y las células control (4B).

TABLA 3.- Area citoplasmática marcada con con-A fría, anti con-A rodamina y fluoresceína-bsa-manosa

Porcentaje del citoplasma marcado con fluorescencia	Grupos de tratamiento Número de células	
	Tratadas	Control
0 - 24	2	6
25 - 49	2	5
50 - 74	0	3
75 - 100	8 *	3

Tratadas es el grupo de células HT-29 indiferenciadas incubadas con 0.2 mM de Ind comparada con el grupo control (0.6% dmsó). La evaluación estadística muestra una significación de * p<0.001, calculada por el test de χ^2 . El área fue calculada dividiendo la superficie de cada célula fotografiada en las mismas condiciones en 16 cuadrados iguales.

Discusión

La línea celular HT-29, proveniente de un carcinoma colónico humano, posee la característica de diferenciarse a células intestinales embrionarias cuando el medio de cultivo es privado de glucosa. El reemplazo de glucosa por inosina desencadena la diferenciación celular a células mucosas o de absorción. Este proceso de dife-

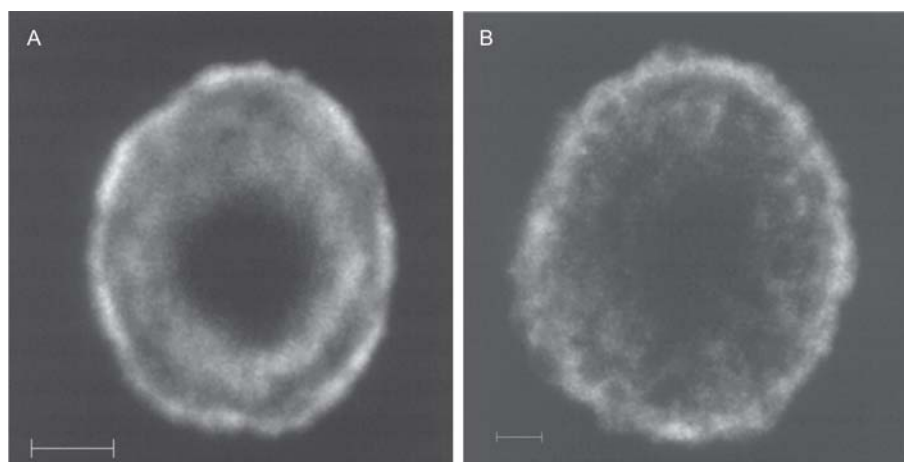


Fig 4.— Adhesión y estiramiento celular. La adhesión y el estiramiento celular dependen de la distribución de proteínas glicosiladas, por lo tanto se estudió por microscopio confocal la distribución de las especies glicosiladas afines a la con-A. Las células fueron marcadas doblemente con moléculas fluorescentes, con-A fría- anti-con-A-rodamina y el receptor de la manosa se detectó con la neoglicoproteína bsa-manosa-fluoresceína. La distribución se estudió en células HT-29 tratadas con 0.2 mM Ind, control (0.6% dms) y estándar (medio de cultivo). A) Células HT-29 tratadas con Ind, el citoplasma se encuentra densamente marcado con ambos marcadores. Mientras que las células controles y estándar B) presentan un patrón de gotas de bsa-manosa fluoresceína y una débil acumulación de co-marcaación de con-A rodamina y bsa-manosa. La escala es de 5 µm. Las fotos son representativas de tres experimentos independientes.

renciación celular se acompaña de cambios en el metabolismo de la glucosa y de la energía celular. Las células indiferenciadas HT-29 presentan el doble de la actividad hexoquinasa, fosfofructoquinasa-1 y piruvato quinasa⁷, resultado de la baja actividad oxidativa mitocondrial en presencia de glucosa y de la desregulación del complejo hexoquinasa-poro mitocondrial^{B, 27}.

La Ind fue motivo de estudio como droga antineoplásica en investigación clínica. En el cáncer de pulmón a células pequeñas, el pretratamiento con Ind aumenta la actividad del vm-26²⁸; en cáncer de mama su efectividad es discutida^{29, 30}. La Ind fue probada también para el tratamiento de la hiperplasia benigna prostática, fase III³¹, pero las investigaciones clínicas se suspendieron en Europa y Canadá por la aparición de toxicidad³².

En este trabajo se utilizó una concentración no tóxica de Ind para tratar las células HT-29 indiferenciadas. Los resultados mostraron que la droga inhibe el crecimiento celular, probablemente en la fase G1, manteniendo la misma tasa de síntesis de proteínas, como fue observado anteriormente por Floridi y col.³³, y baja la incorporación de timidina al ADN; coincidiendo con los hallazgos de Luciani y col en células HeLa³⁴, la Ind no tiene efecto en las células en fase S, descrito por Ricotti en células HCC (carcinoma hepatocelular)³⁵. El efecto de la Ind observado en las células HT-29 sobre el crecimiento celular no puede ser atribuido ni a la muerte celular ni al au-

mento de la proporción de células en suspensión (los valores no se muestran). En este trabajo se investigó, además, el efecto de la Ind sobre la formación de colonias celulares en agar, modelo del crecimiento celular independiente al sustrato y de potencialidad metastásica *in-vitro*. La Ind no permite la formación de colonias celulares. El efecto de la Ind investigado en la línea célula LoVo (carcinoma colónico), a la misma dosis utilizada en este trabajo, no demostró ningún efecto clonogénico sobre esas células³⁶. Muchos de los efectos quimioterapéuticos de la Ind se estudiaron en tumores resistentes a otros agentes farmacológicos. En las células HT-29 tratadas durante 24 h con Ind a una concentración de 0.150-0.225 mM, se observó un aumento del efecto del bcnu (carmustina) y la mitomicina C³⁷. Además, en células HepG-2 resistentes a la doxorubicina, la combinación de esta droga con Ind determinó la muerte celular³⁸; y Sordet y col. mostraron que la Ind inhibe la diferenciación celular de las células leucémicas U-937 y HL-60 desencadenada por el éster de forbol³⁹. Además, Miyato y col. demostraron que la Ind aumenta la muerte celular por apoptosis de un melanoma humano *in-vitro* cuando se combina con tratamiento radiante⁴⁰. Tal vez, en las células HT-29 indiferenciadas, la concentración de 0.2 mM Ind sea capaz de desencadenar los primeros pasos del fenómeno apoptótico sin que el proceso progrese a la muerte celular o autofagia, como ha sido demostrado con el uso de rojo neutro, marcador de la integridad

lisosomal, y con el azul de tripán, marcador de la permeabilidad de membrana celular. En las células HT-29 tratadas con dmsó se produjo la inducción de la apoptosis y el aumento del *shedding* celular⁴¹. En este trabajo, el ensayo del rojo neutro mostró que la toxicidad del dmsó sobre esta línea celular se correlaciona con su concentración en medio de cultivo, pero el efecto Ind-dmsó, no clarifica si esta asociación es agonista o antagonista; en la mayoría de los datos obtenidos en este trabajo, no se observaron diferencias entre las células tratadas con 0.6% dmsó (v/v) o medio de cultivo.

Otro de los aspectos investigados fueron los metabólicos. La tasa de incorporación de la glucosa exógena al glucógeno se podría correlacionar con el crecimiento lentificado que presentan las células tratadas con Ind, porque la misma tasa de síntesis de glucógeno se encontró en las tratadas con Ind, pero dos días retrasada con respecto a los controles. Este resultado se correlaciona con la tasa de entrada de glucosa a la célula y la secreción de ácido láctico, y podría ser explicado por un efecto inhibitorio transitorio de la Ind sobre el metabolismo de la glucosa o a que la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/ fructosa-2,6 bifosfatasa, altamente expresada en cánceres humanos, resulte de una vía metabólica alternativa, compensando el efecto de la Ind sobre la hexoquinasa⁴². Sin embargo, si correlacionamos este resultado con la síntesis de ADN, podría pensarse que en la célula tratada con Ind habría una disminución de la vía de las pentosas para poder mantener los niveles de energía celulares a través de la glucólisis.

Las características de la síntesis de N-glicanos en las células HT-29 se correlaciona con la citodiferenciación^{19, 43}. El tratamiento con Ind no produjo alteraciones en la tasa de síntesis de glicopéptidos afines a la lectina con-A en estas células. Sin embargo, los estudios sobre la distribución de las moléculas afines a la con-A y a la neoglicoproteína-bsa-manosa muestran diferencias entre las células tratadas con Ind y los controles. La importancia de esta distribución modificada se debe a que la neoglicoproteína nos permite la detección de una variedad de proteínas como el Endo180 / activador del plasminógeno tipo uroquinasa, receptores asociados al receptor a la manosa; el receptor a la fosfolipasa A2, y el DEC-205/ MR6-gp200 asociado al receptor de la IL-4. Estos receptores tienen en común que se reciclan entre la membrana celular y los compartimentos intracelulares, con la función de interiorizar ligandos glicosilados⁴⁴. La asociación de la distribución de la neoglicoproteína-bsa-manosa junto con las moléculas afines a la lectina con-A sugiere que la Ind desencadena modificaciones en el reciclado de los ligandos glicosilados como integrinas y receptores. Esta redistribución puede ser debida a que la Ind disminuye el pH de las organelas celulares⁴⁵.

Las células HT-29 tratadas previamente con Ind readquieren la característica de formar colonias en agar cuando la droga es removida, característica inhibida en presencia de Ind. La rápida reversibilidad del efecto del tratamiento de la Ind en 24 h explica por qué es necesaria una elevada concentración de la droga en sangre para lograr efecto terapéutico, observado en cáncer de ovario⁴⁶. Los resultados de este trabajo sugieren que el efecto de la Ind es transitorio y rápidamente reversible, observado después de la terminación del tratamiento, en las células indiferenciadas HT-29, y esta sería una razón poderosa que explicaría por qué la Ind tiene que ser combinada con otros tratamientos antineoplásicos más potentes para desencadenar la muerte de la célula tumoral. Recientemente se ha observado que la Ind tiene efecto sobre la funcionalidad de las células endoteliales en cultivo, lo que la postula nuevamente como droga adyuvante antineoplásica con características antiangiogénicas⁴⁷.

Agradecimientos: Agradezco a la Dra. Michèle Aubery y al Dr. Patrice Codogno por apoyar este trabajo y por brindarme la oportunidad de realizarlo en la U 180 del INSERM, *Glycobiology et Reconnaissance Cellulaire, Nouvelle Faculté de Médecine de Saints Pères*, Paris, Francia, subsidiado por la *Fondation pour la Recherche Médicale* y el *Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM- Francia), al Laboratorio Roemmers SAICF Argentina y a la Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires, Argentina. Agradezco al Dr. Gérard Géraud del *Institut Jacques Monod* por su desinteresada ayuda en las observaciones realizadas en microscopía confocal. Agradezco a la Dra. Annie-Pierre Sève (†) por introducirme en el tema de las neoglicoproteínas. Agradezco a la Dra. Marta Dubin, y al Dr. Samuel Mc Cann (†) por sus inteligentes observaciones.

Bibliografía

1. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 132-4.
2. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH. Mitochondrial bound hexokinase type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and a ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1555: 14-20.
3. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5899-912.
4. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. Identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem* 2001; 276: 4307-12.
5. Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59: 221-5.
6. Fogh J, Trempe G In: J Fogh (Ed), Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press 1975, p 115-41.
7. Gauthier T, Denis-Pouxviel C, Murat JC. Carbohydrate metabolism in HT-29 colon cancer cells cultured in a

- glucose free medium supplemented with inosine. *Int J Cancer* 1989; 21: 191-6.
8. Denis-Pouxviel C, Riesinger I, Buhler, Bradiczka D, Murat JC. Regulation of mitochondrial hexokinase in cultured HT-29 human cancer cells. An ultrastructural and biochemical study. *Biochem Biophys Acta* 1987; 902: 335-48.
 9. Floridi A, Paggi MG, D'Atri S, et al. Effect of lonidamine on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 1981; 41: 4661-6.
 10. Oudard S, Carpentier A, Banu E, et al. Phase II study of lonidamine and diazepam in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2003; 63: 81-6.
 11. Pulselli R, Amadio I, Fanciulli M, Floridi A. Effect of lonidamine in-situ in Ehrlich ascitis tumor cells. *Anticancer Res* 1996; 16: 419-23.
 12. Ravagnan L, Marzo I, Costantini P, et al. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibit effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene* 1999; 18: 2537-46.
 13. Belzacq A.S, El Hamel C, LA Vieira H, et al. Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene* 2001; 20: 7579-87.
 14. De Cesare M, Pratesi G, Guisti A, Polizzi D, Zunino F. Stimulation of the apoptotic response as a basis for the therapeutics synergism of lonidamine and cisplatin in combination in human tumour xenograft. *Br J Cancer* 1998; 77: 434-9.
 15. Pratesi G, De Cesare M, Zunino F. Efficacy of lonidamine combined with 17 different DNA-damaging agents in the treatment of the MX-1 tumor xenograft. *Cancer Chemotherapy Pharmacol* 1996; 38: 123-8.
 16. Dogliotti L, Danese S, Berruti A, et al. Cisplatin, epirubicin and lonidamine combination regimen as first line chemotherapy for metastases breast cancer. *Cancer Chemotherapy Pharmacol* 1998; 41: 333-8.
 17. De Lena M, Lorusso V, Bottalico C, et al. Revertant and potentiating activity of lonidamine in patients with ovarian cancer previously treated with platinum. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3208-21.
 18. Gabius HJ, Vehmyer K, Engelhardt RA, Nagel GA, Cramer F. Carbohydrate-binding proteins of tumor lines with different growth properties II. Changes in the pattern in clones of transformed rat fibroblasts of differing metastatic potential. *Cell Tissue Res* 1986; 246: 515-21.
 19. Ogier-Denis E, Codogno P, Chantret I, Trugnan G. The processing as asparagine-linked oligosaccharide in HT-29 cells in a function of their state of enterocyte differentiation. An accumulation of Man_{9,8}-GlucNac₂-Asn species is indicative of an impaired N-glycan trimming in undifferentiated cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 6031-7.
 20. Houry JJ, Ogier-Denis E, De Stefanis D, et al. Differentiation-dependent autophagy controls the fate of newly synthesized glycoproteins in the colon adenocarcinoma HT-29 cell. *Biochem J* 1995; 309: 521-7.
 21. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 364-86.
 22. Babich H, Borenfreund E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined by neutral red cell viability assay. *Appl Environm Microbiol* 1991; 2101-3.
 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
 24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 1970; 227: 680-5.
 25. Antony C, Cibert C, Géraud G, et al. The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial golgi to the trans-golgi network as determined by confocal microscopic approach. *J Cell Science* 1992; 103: 785-96.
 26. Wardlaw AC (Ed) Practical Statistics for experimental biologists. Chichester, UK: John Wiley & sons, 1989.
 27. Gauthier T, Denis-Pouxviel C, Paris H, Murat JC. Study on ATP-generating system and related hexokinase activity in mitochondria isolated from undifferentiated or differentiated HT-29 adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Acta* 1989; 975: 231-8.
 28. Gridelli C, De Marinis F, Rossi A, et al. A phase II study of VM-16 plus lonidamine in pretreated small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 1277-9.
 29. Nistico C, Garufi C, Milella M, et al. Weekly epirubicin plus lonidamine in advanced breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56: 233-7.
 30. Papaldo D, Lopex M, Cortesi E, et al. Addition of either lonidamine or granulocyte colony stimulating factor does not improved survival in early breast cancer treated with high dose epirubicin and cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3462-8.
 31. Ditonno P, Battaglia M, Selvaggio O, Garofalo L, Lorusso V, Selvaggi FP. Clinical evidence supporting the role of lonidamine for the treatment of BPH. *Rev Urol* 2005; 7 suppl 7: S27-33.
 32. Medscape Hematology Oncology. Reuters Health information. (May 12, 2006). FDA suspends clinical trials of lonidamine for BPH. En: <http://japan.medscape.com/viewarticle/532261>
 33. Floridi A, Delpino A, Nista A, et al. Effect of lonidamine on protein synthesis in neoplastic cells. *Exp Mol Pathol* 1984; 42: 293-305.
 34. Luciani AM, Rosi A, Matarresse P, Arancia G, Guidoni L, Viti V. Changes in cell volume and internal sodium concentrations in HeLa cells during exponential growth and following lonidamine treatment. *Eur J Cell Biol* 2001; 80: 187-95.
 35. Ricotti L, Tesei A, De Paola F, et al. Potentiation of anti-proliferative drug activity by lonidamine in hepatocellular carcinoma cells. *J Chemother* 2003; 15: 480-7.
 36. Fanciulli M, Bruno T, Giovannelli A, et al. Energy metabolism of human LoVo colon carcinoma cells: correlation to drug resistance and influence of lonidamine. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1590-7.
 37. Villa R, Zaffaroni N, Orlandi L. In vitro effect of lonidamine on the cytotoxicity of mitomycin C and BCNU in human colon adenocarcinoma cells. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1534-40.
 38. Li YC, Fung KP, Kwok TT, Lee CY, Suen YK, Kong SK. Mitochondrial targeting drug lonidamine triggered apoptosis in doxorubicin resistant HepG2 cells. *Life Sci* 2002; 71: 2729-40.
 39. Sordet O, Rébè C, Leroy I, et al. Mitochondria-targeting drugs arsenic trioxide and lonidamine bypass the resistance of TPA-differentiated leukemic cells to apoptosis. *Blood* 2001; 97: 3931-40.
 40. Miyato Y, Ando K. Apoptosis of human melanoma cells by a combination of lonidamine and radiation. *J Radiat Res* 2004; 45: 189-94.
 41. Heerdt BG, Houston MA, Rediske JJ, Augenlicht LH. Steady state levels of mitochondrial messenger RNA species characterize a predominant pathway culminating in apoptosis and shedding of HT-29 human colonic carcinoma cells. *Cell Growth Diff* 1996; 101-6.

42. Atsuni T, Chesney J, Metzel C, et al. High expression of inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase/ Fructose-2,6-Bi-phosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* 2002; 62: 5881-7.
43. Fuchs AG, Ogier-Denis E, Bauby C, Codogno P, Aubery M. Relationship between the content of [14-C] glucose-derived monosaccharides in glycoprotein oligosaccharide chains and the state of enterocytic differentiation of HT-29 cells. *Carbohydrate Res* 1992; 236: 97-105.
44. Howard JM, Isake CM, The C-type lectin receptor Endo 180 displays internalisation and recycling properties distinct from other members of the mannose receptor family. *J Biol Chem* 2002; 277: 32320-32.
45. Dell'Antone P, Piergallini L. The antineoplastic drug lonidamine interferes with the acidification mechanism of cell organelles. *Biochim. Biophys Acta* 1997; 1358: 46-52.
46. Bottalico C, Lorusso V, Brandi M, et al. Correlation between HPLC-determined lonidamine serum levels and clinical response in patients with advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 1996; 16B: 3865-9.
47. Del Bufalo D, Trisciualo D, Scarsella M, et al. Lonidamine causes inhibition of angiogenesis related endothelial cell functions. *Neoplasia* 2004; 6: 513-22.

LA TAPA

Abraham Resnik. Casas y chimeneas. 2007

Técnica mixta, 48 × 35 cm

Abraham Resnik nació en Buenos Aires en 1919. Se inició en la pintura hacia 1950 y de su actividad inicial dio muestras en varias galerías argentinas: Van Riel, Witcomb, Sociedad Argentina de Artistas Plásticos, Gente de Arte de Avellaneda, Salón de Arte de Mar del Plata, Asociación Médica de Cultura Artística, entre otros. A partir de 1960 vivió y desarrolló su obra fuera de la Argentina. A lo largo de quince años su itinerario lo llevó a Chile, Ecuador, Bolivia, EE.UU., Europa y Asia. En algunos lugares permaneció años. Y fue en Bolivia donde, según Roy Bartholomew, *attaché* cultural de la Embajada Argentina en La Paz, "Resnik halló clara y múltiple incitación en el tema de "la diablada" y, al margen de sus tareas médicas en una organización internacional, expuso en trece grandes óleos la multiplicidad de su paleta y de su motivación". Esta muestra se llevó a cabo en el Museo Nacional de Arte, La Paz, enero de 1968. En 1974 fue invitado a exponer en la galería Vercamer, de París.

Y durante años, el Asia... Recorrió todo el extremo oriente: Japón, Malasia, Hong Kong, Filipinas, Singapur, y además, la India. Pero donde se detuvo especialmente fue en Tailandia y Laos, cuyo mundo ofreció al artista motivos de inspiración.

María Laura San Martín comentaba el refinamiento delicado de Resnik, de formación artística autodidacta y con algunas influencias de Soldi¹. Vuelto a su patria, Resnik recrea colores y formas de su ciudad y plasma en la tela además, las visiones multicolores de un inmenso periplo por el ancho mundo, calidoscopio inagotable de su nostalgia².

¹San Martín ML. Pintura argentina contemporánea. Buenos Aires: Editorial La Mandrágora, 1961.

²Gruskin EM. Galería de Arte Suipacha. Catálogo exposición "Resnik, pinturas" Buenos Aires, noviembre 30-diciembre 14, 2007.