

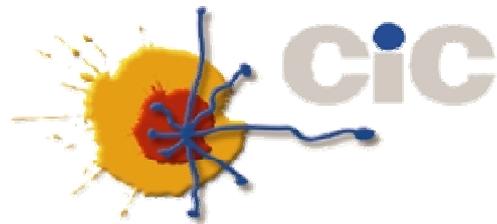
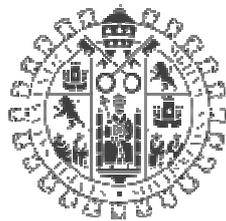


**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES
AL TRATAMIENTO CON FÁRMACOS REGULADORES DE LA
ACTIVIDAD EPIGENÉTICA**

CARLOS JIMÉNEZ CRIADO

**TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Centro de Investigación del Cáncer
Salamanca 2014**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER

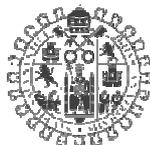


TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LÍNEAS
CELULARES TUMORALES AL TRATAMIENTO
CON FÁRMACOS REGULADORES DE LA
ACTIVIDAD EPIGENÉTICA**

Carlos Jiménez Criado

2014



El Dr. D. Rogelio González Sarmiento, catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y director del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL),

CERTIFICA:

Que el trabajo *“Análisis de la respuesta de líneas celulares tumorales al tratamiento con fármacos reguladores de la actividad epigenética”* que presenta el Licenciado en biología D. Carlos Jiménez Criado ha sido realizado bajo mi dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 6 de Junio de 2014

Fdo. Dr. D. Rogelio González Sarmiento

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente al Dr. D. Rogelio González Sarmiento su dedicación y su entrega en el desarrollo de esta tesis. Por sus consejos, su apoyo, confianza y por haberme formado como científico y como persona.

Gracias a todo el laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer por su colaboración en el desarrollo de este trabajo. No me puedo olvidar de agradecer a José M^a. González Valero y Juan Luis García Hernández del laboratorio 12, al laboratorio 5 y al laboratorio 15 su constante ayuda y consejo en el desarrollo de esta tesis y a Luis A., a Norma G. y a Fernando S. del IBSAL por estar siempre dispuestos a colaborar.

Por último, agradecer a las entidades financiadoras de este trabajo: el Fondo Social Europeo, la Junta de Castilla y León, al proyecto *FIS PI10/00219*, a todo Centro de Investigación del Cáncer, IBSAL y al Hospital Universitario de Salamanca por haberme proporcionado todos los recursos económicos y logísticos necesarios para llevar a cabo esta tesis.

*El presente trabajo ha sido co-financiado por el Fondo Social Europeo
y el Proyecto FIS PI 10/00219*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
<i>EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER.....</i>	<i>3</i>
<i>¿QUÉ ES EL CÁNCER Y CÓMO SE PRODUCE.....</i>	<i>3</i>
<i>MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....</i>	<i>4</i>
<i>REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA CROMATINA.....</i>	<i>5</i>
<i>MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS.....</i>	<i>7</i>
<i>Acetilación de histonas.....</i>	<i>8</i>
<i>Metilación de histonas.....</i>	<i>12</i>
<i>Fosforilación de histonas.....</i>	<i>15</i>
<i>Desiminación.....</i>	<i>15</i>
<i>β-N-acetilglucosaminación.....</i>	<i>15</i>
<i>ADP ribosilación.....</i>	<i>16</i>
<i>Ubiquitinación y sumoilación.....</i>	<i>16</i>
<i>METILACIÓN DEL ADN.....</i>	<i>18</i>
<i>REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN MEDIANTE MIARNs.....</i>	<i>21</i>
<i>Biogénesis de miARNs.....</i>	<i>22</i>
<i>MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS Y TUMOROGÉNESIS.....</i>	<i>24</i>
<i>Inhibidores de HDAC endógenos.....</i>	<i>25</i>
<i>NUEVOS FÁRMACOS REGULADORES DE LA ACTIVIDAD EPIGENÉTICA.....</i>	<i>26</i>
<i>Proteínas HDAC como posibles dianas terapéuticas.....</i>	<i>26</i>
<i>Tipos de inhibidores de HDAC.....</i>	<i>28</i>
<i>Panobinostat®, inhibidor de HDAC.....</i>	<i>30</i>
<i>Agentes hipometilantes. Nuevas estrategias de tratamiento anticancerígeno... ..</i>	<i>32</i>
<i>Tipos de inhibidores de metilación.....</i>	<i>34</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
METODOLOGÍA.....	41
<i>REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO.....</i>	<i>43</i>
<i>ANTICUERPOS.....</i>	<i>44</i>
<i>CULTIVOS CELULARES.....</i>	<i>44</i>
<i>EXTRACCIÓN DE ADN DE LÍNEAS CELULARES.....</i>	<i>45</i>
<i>EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....</i>	<i>47</i>
<i>PCR Y GENOTIPADO.....</i>	<i>47</i>
<i>ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....</i>	<i>49</i>
<i>SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA.....</i>	<i>49</i>
<i>ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI).....</i>	<i>50</i>

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	51
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT.....	51
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE).....	52
IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	54
SISTEMA DE IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY Y HPLC-MASAS (LC-ESI-MS/MS).....	55
MALDI-TOF/TOF.....	56
ANÁLISIS DE DATOS DE MS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	57
EXTRACCIÓN DE MIARN Y MICROARRAY.....	57
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	58
IDENTIFICACIÓN DE DIANAS DE MIARN.....	58
ANÁLISIS DE REACTIVIDAD DE COMPUESTOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	59
ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	59
ANÁLISIS DEL CICLO Y LA MUERTE CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	60
RESULTADOS.....	61
<i>CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE PANOBINOSTAT® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA.....</i>	
MAMA.....	63
<i>Genotipado de líneas celulares.....</i>	63
<i>Análisis de la inestabilidad de microsatélites (MSI).....</i>	63
<i>Análisis del efecto de panobinostat® sobre la acetilación de histonas en líneas celulares tumorales.....</i>	64
<i>Análisis del efecto de panobinostat® sobre la expresión de HDAC en líneas celulares tumorales.....</i>	65
<i>Estudio del efecto de panobinostat® en la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales.....</i>	66
<i>Estudio del efecto de panobinostat® en la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores de mama.....</i>	68
<i>Análisis de la expresión de proteínas del ciclo celular en respuesta al tratamiento con panobinostat®.....</i>	73
<i>Análisis global del proteoma en líneas celulares derivadas de cáncer de mama y colon en respuesta al tratamiento con panobinostat®.....</i>	74
<i>Análisis de los niveles de ácido láctico en el cultivo celular.....</i>	78
<i>Análisis de la regulación de la expresión de miARNs en líneas celulares tumorales incubadas con panobinostat®.....</i>	79
<i>Análisis de los patrones de expresión de miARN en líneas celulares hematológicas y líneas celulares epiteliales en respuesta panobinostat®.....</i>	82
<i>EFFECTO DE DECITABINA® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA.....</i>	<i>.88</i>

<i>EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE PANOBINOSTAT® Y DECITABINA® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA.....</i>	<i>95</i>
DISCUSIÓN.....	107
<i>CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE PANOBINOSTAT® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA.....</i>	<i>110</i>
<i> Panobinostat® modifica los niveles de acetilación de las líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de mama.....</i>	<i>112</i>
<i> Panobinostat® modifica la viabilidad de líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de mama.....</i>	<i>113</i>
<i> Panobinostat® modifica el proteoma de líneas celulares derivadas de cáncer de colon y cáncer de mama.....</i>	<i>117</i>
<i> Panobinostat® modifica la expresión de miARNs en líneas celulares de cáncer de colon, cáncer de mama y mieloma múltiple.</i>	<i>119</i>
<i>DECITABINA® MUESTRA POCA ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA.....</i>	<i>121</i>
<i>PANOBINOSTAT® Y DECITABINA® ACTÚAN DE MANERA SINÉRGICA SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA.....</i>	<i>121</i>
CONCLUSIONES.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	129

Abreviaturas

5-aza-C: 5-aza-citidina

5-aza-DC: 5-aza-2'-desoxicitidina (Decitabina®)

5-F-dC: 5-fluoro-2'-desoxicitidina

Acetil-Coa: Acetil coenzima-A

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AdoHcy: S-adenosil-L-homocisteina

AdoMet: S-adenosil-L-metionina

ADP: Adenosin difosfato

AGO: Proteína Argonauta

APAF1: Apoptosis protease-activating factor-1 (*factor activador de proteasa apoptótica 1*)

APC: Adenomatous polyposis coli

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: Acido ribonucleico interferente

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNnc: Ácido ribonucleico no codificante

ARNsi: Ácido ribonucleico pequeño interferente

ATM: Ataxia telangiectasia mutado

ATP: Adenosin trifosfato

ATR: Ataxia telangiectasia receptor

AURKA: Aurora kinasa A

AURKB: Aurora kinasa B

BAH: Dominio rico en bromo

BASC: Complejo de proteínas asociadas a BRCA1

Bcl2: B-cell lymphoma 2

BRCA1: Breast cáncer 1

BRCT: Repeticiones BRCA1 C-terminal

BSA: Seroalbúmina bovina

CBP/p300: Complejo proteína de unión a CREB/proteína de unión E1A p300

CDK: Kinasas dependientes de ciclina

CHAPS: 3-(cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato

CHECK2: CHK2 checkpoint homologo

CIAA: Cloroformo:alcohol isoamílico

CIN: Inestabilidad cromosómica

Co-REST: Correpresor del factor de silenciamiento transcripcional RE1

CpG: Regiones ricas en citosinas y guaninas

CTCL: Linfoma cutáneo de células T

CXXC: Motivo de unión a secuencias CpG

D.O.: Densidad óptica

D: Ácido aspártico

ddH₂O: Agua bidestilada

DICER: Ribonucleasa miembro de la familia de las RNasa III

DIGE: Difference gel electrophoresis (gel de electroforesis diferencial)

DIM5: Histona-lisina N-metiltransferasa

DMAP1: Proteína 1 asociada a ADN metiltransferasa 1

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's médium

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNMT: ADN metiltransferasa

DROSHA: RNasa Clase III

DSB: Doble Strand Breaks (roturas de doble cadena)

dsRBD: Doble strand Breaks (roturas de doble cadena)

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

EF2: Factor de elongación 2

ERB2: Receptor tirosin-protein kinasa ErB2

ERBB4: Proteína tirosin-kinasa receptora

F: Fenilalanina

FACS: Separador de células activado por fluorescencia

FAD⁺: Flavín adenín dinucleótido

FBS: Suero fetal bovino

FDA: Food and Drug Administration

Fe: Hierro

GNAT: N-Acetiltransferasa relacionada con GCN5

GTP: Guanidin trifosfato

H: Histona

H2AK119ub1: Ubiquitin lisina de la histona H2A

H3K56: Histona 3 lisina 56

HAT: Histona acetiltransferasa

HDA1: Histona desacetilasa de levaduras

HDAC: Histona desacetilasa

HDACi: Inhibidor/es de histonas desacetilasas

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HER2: Ver Erb2

HIC1: Hypermethylated in cancer 1

HKMT: Histona lisina desmetilasa

HMT: Histona metiltransferasa

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

Hsp27: Heat shock protein beta-1

IDL: Bucle temporal de inserción-delección

IPG: Gradient de pH immobilizado

JMJD: Proteína Jumonji

K: Lisina

KG-linker: Sitio rico en glicinas y lisinas

LC-ESI-MS/MS: Electrospray tandem mass Spectrometry

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crónica

LSD1: Lisina-específica desmetilasa

MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization

MDS: Síndrome mielodisplásico

MGMT: O-6-alquilguanina ADN alquiltransferasa

miARN: Micro ácido ribonucleico

miRNPs: Complejo microARN ribonucleoproteína

MLH1: MutL homólogo 1

MMR: Mismatch repair

MSI: Inestabilidad de microsatélites

MSI: Inestabilidad de microsatélites

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

MYST: Familia de Lisina acetiltransferasas

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NLS: Señal de localización nuclear

O-GlcNAc: β-N-acetilglucosamina

O-GlcNAcasa: β-N-acetilglucosaminidasa

P15: Tumor protein 15

P53: Supresor tumoral proteína 53

PADI4: Peptidil-deiminasa 4

PAGE: Electroforesis en gel de acrilamida

PARP: Poli-ADPribosa polimerasa

Pb: Pares de bases

PBHD: Dominio de homología a polibromos

PBS: Tampón salino de fosfato

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PCR: *Reacción en cadena de la polimerasa*

PMSF: *Fluoruro de fenilmetilsulfonilo*

PPP2R1A: *Serine/treonin-protein fosfatasa*

PRMT: *Arginina metiltransferasa*

PTEN: *Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa*

PVCF: *Polifluoruro de vinilideno*

r.p.m.: *Revoluciones por minuto*

RB1: *Retinoblastoma*

RBBP7: *Proteína de unión a histonas*

RE: *Receptor de estrógenos*

RFTS: *Secuencia de unión a sitios de replicación*

RISC: *Complejo de inducción de silenciamiento de ARN*

Rme1: *Argina con un grupo metilo*

Rme2: *Arginina con dos grupos metilo*

RP: *Receptor de progesterona*

RPD3: *Histona desacetilasa de levaduras homologa a HDAC3 humana*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SAHA: *Ácido suberoylanilido hidroxámico (Vorinostat®)*

SAM: *S-adenosilmetionina*

SAM: *Significance Analysis of Microarrays (Análisis de significancia de microarrays)*

SDH: *Succinato deshidrogenasa*

SDS: *Dodecil sulfato sódico*

SET: *Dominio de metilación presente en las HKMTs*

SIRT/Sir: *Sirtuina*

SNAP: *Scalable Nucleotide Alignment Program (Programa de alineamiento de nucleótidos)*

SUMO: *Small ubiquitin-like modifier (modificador pequeño similar a ubiquitina)*

TBT-T: *Tampón salino tween-20*

TDAC: *Tubulina desacetilasa*

TFA: *Ácido trifluoroacético*

TNF: *Factor de necrosis tumoral*

TOF: *Time-of-flight (tiempo de vuelo)*

TP63: *Tumor protein 63*

TSA: *Trichostatin A*

UE: *Unión Europea*

UTR: *Untranslated región (region no traducida)*

VEGF: *Factor de crecimiento endotelial vascular*

W: *Triptófano*

WHO: *World Health Organization (Organización mundial de la salud)*

Y: *Tirosina*

Introducción

INTRODUCCIÓN

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

Actualmente se diagnostican 12.5 millones de casos anuales de esta enfermedad en el mundo, aunque la tasa podría aumentar hasta los 15 millones de nuevos casos en el año 2020 según el Informe Mundial sobre el Cáncer de 2011. Sin embargo, los estilos de vida saludables y las medidas de concienciación sobre el diagnóstico precoz tomadas por los gobiernos y los profesionales de la salud podrían frenar esta tendencia y evitar hasta un tercio de los cánceres en todo el mundo (Datos WHO).

El cáncer es la principal causa de mortalidad en los países desarrollados y una de las más importantes en aquellos que están en vías de desarrollo. Dentro de los primeros, la incidencia de cada tipo de cáncer depende de los hábitos de vida de cada individuo y puede variar entre los distintos estratos de la sociedad¹. Una de cada cuatro muertes se debe al cáncer en los países en vías de desarrollo¹.

Se estima que actualmente se diagnostican en España alrededor de 162.000 casos de cáncer cada año (excluyendo el cáncer de piel no melanoma), de los cuales 25.600 corresponden a carcinomas colorrectales, el tipo más frecuente de tumor en términos absolutos. El siguiente tumor en frecuencia es el cáncer de pulmón con 18.800 casos nuevos, seguido del cáncer de mama en mujeres con 15.979 casos. Cuando se compara la incidencia de cáncer con la de los países vecinos, España muestra tasas de incidencia en los varones mayores que la media de la UE, ocupando el 5º lugar. Sin embargo, nuestro país se sitúa en primer lugar en incidencia del cáncer de vejiga en los hombres, con tasas que son considerablemente más altas que los del resto de los países. Por el contrario, en mujeres, España muestra las tasas más bajas junto con Grecia².

¿QUÉ ES EL CÁNCER Y CÓMO SE PRODUCE?

El cáncer es una enfermedad del genoma. Desde el punto de vista molecular, no se considera una única enfermedad, sino muchas enfermedades. Hay más de 100 tipos diferentes, de los cuales la mayoría toman el nombre del órgano o de las células donde se

originan, siendo distinta la incidencia para cada tipo de tumor. El cáncer puede considerarse un conjunto de enfermedades producidas como consecuencia de alteraciones genéticas progresivas que incluyen, entre otras, mutaciones en genes supresores de tumor, oncogenes y anormalidades cromosómicas³.

Para que una célula se transforme en célula cancerosa deben de ocurrir una serie de sucesos secuenciales y cambios a nivel celular y tisular provocados por el propio entorno celular o por factores externos⁴. Aunque continuamente se producen errores en nuestro ADN, la célula cuenta con un sistema de reparación de errores que los corrigen y eliminan. En caso de no poder repararse, se induce la muerte de la célula⁴.

Además de los mecanismos de reparación de errores, la célula requiere, para su correcto funcionamiento, un conjunto de mecanismos de regulación de la expresión génica que forman una red muy compleja. Éstos actúan a muchos niveles. Por ejemplo, el control de la expresión de genes a nivel de transcripción, transporte al citoplasma del ARNm, traducción a proteínas, control de la remodelación de las proteínas del entorno celular, regulación de las vías de señalización mediante inhibidores y activadores intrínsecos, regulación de la expresión génica mediante miARNs, etc.

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los mamíferos son organismos multicelulares complejos por lo que es necesaria una extensa red de regulación celular para que funcionen correctamente. La expresión génica está influida por cambios en la estructura de la cromatina, la cual puede verse afectada por diversos mecanismos, entre ellos incluimos las modificaciones de las histonas que activan o reprimen la iniciación de la transcripción por unión de complejos de proteínas y elementos reguladores al ADN, esto se conoce como regulación epigenética. Otros mecanismos de control se producen a nivel del procesamiento, degradación y traducción de ARNm y procesos postraduccionales.

Es conveniente tener en cuenta tres grandes niveles para la regulación de la expresión génica:

- *Regulación transcripcional de la expresión génica:* la expresión de los genes se inicia por la unión de factores de transcripción al promotor. La regulación de la expresión génica puede ocurrir a través de la activación o represión del promotor de un gen, a nivel de reclutamiento de proteínas de lectura de la cadena de ADN y síntesis de ARNm y a nivel de la procesividad de la ARN polimerasa. Además, los niveles basales de transcripción pueden ser modulados mediante la unión de factores proteicos a otras regiones reguladoras que se encuentran en las secuencias que flanquean el gen o, incluso, dentro de intrones del mismo. Se los conoce como *enhancers*^{5,6}.
- *Regulación post-transcripcional de la expresión génica:* esta categoría incluye mecanismos que actúan sobre el procesamiento (*splicing*) del ARN, como el corte y empalme del ARNm. Además del procesamiento, hay otros niveles en los que puede tener lugar un control de la expresión génica entre los que se incluyen el transporte y la estabilidad del ARNm, la traducción, el procesamiento de las proteínas, la existencia de proteínas transportadoras, estabilidad de las proteínas, etc⁷.
- *Mecanismos epigenéticos:* existen un conjunto de factores que pueden ser transmitidos a la descendencia de células pero que no son directamente atribuibles a la secuencia de ADN. Se conocen como mecanismos epigenéticos entre los que destacan la modificación postraduccional de las histonas y la metilación del ADN, que actúan como un sistema general de activación génica y para mantener la represión de la transcripción respectivamente. Además, se conocen una gran variedad de mecanismos que afectan a la cromatina, como la fosforilación, la ubiquitinación o la sumoilación, entre otros. Éstos tienen en común la regulación del acceso de las proteínas ARN-polimerasas y ADN-polimerasas al ADN para su expresión⁸.

REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA CROMATINA

El término “Epigenética” fue utilizado por primera vez por Waddington en 1942 para describir el proceso a través del cual los genotipos dan lugar a fenotipos durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*⁹. En términos generales, la epigenética comprende

los cambios en la expresión génica desencadenados por estímulos secundarios a procesos que surgen independientemente de los cambios en la secuencia de ADN. Algunos de estos procesos se conocen bien después de años de estudio como son la metilación del ADN¹⁰, las modificaciones de las histonas, la remodelación de las proteínas de la cromatina¹¹ y el silenciamiento de ADN por pequeños ARN no codificantes (ARNnc)¹².

En eucariotas, el ADN nuclear está empaquetado y estabilizado por un conjunto de proteínas formando la cromatina, siendo las más importantes las histonas¹³, que determinan la estructura de la cromatina y desempeñan un papel central en la regulación génica. Hay cinco tipos de histonas: H1/H5, H2A, H2B, H3 y H4, que forman un octámero llamado nucleosoma, sobre el cual se enrolla el ADN dando dos vueltas. Cada vuelta engloba unas 80 pares de bases¹³. Entre nucleosomas hay entre 10 y 90 pares de bases ocupada por una sola copia de la histona H1 cuya función es enlazar y dar soporte al nucleosoma. En algunos tipos celulares no hay histona H1 y esta función la hace la histona H5¹⁴. Las histonas son esenciales para la compactación de la cromatina (fig. 1).

Desde los estudios pioneros de Vincent Allfrey a principios de los años 60, se sabe que las histonas están sometidas cambios postraduccionales¹⁵. Actualmente sabemos que hay un gran número de modificaciones postraduccionales diferentes que afectan a las histonas. En 1997 se estudiaron los nucleosomas mediante Rayos-X de alta resolución y se observó cómo estos cambios modificaban la estructura de la cromatina al comprobarse que las colas N-terminales de los nucleosomas sobresalían de estos y hacían contacto con nucleosomas adyacentes, de manera que si se modifican estas estructuras, se podría modificar la estructura general de la cromatina¹⁶.

Alrededor de los nucleosomas, el ADN debe estar densamente empaquetado para llegar a conseguir una compactación de unas 10.000-20.000 veces¹⁷ necesaria para adaptar el genoma al pequeño volumen del núcleo, aunque también debe permitir que las proteínas implicadas en la transcripción, replicación y reparación accedan al ADN (fig. 1).

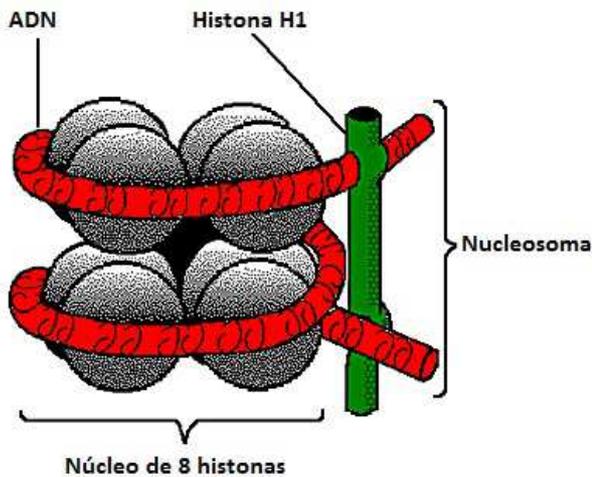


Fig. 1: Estructura del nucleosoma

En últimos 50 años se ha descrito más de 100 modificaciones diferentes de histonas, desde la acetilación de lisinas, la metilación de argininas y lisinas y la fosforilación de lisina, serina y treonina, hasta las más recientemente descubiertas, como es la crotonilación o la sumoilación⁸. Todas estas modificaciones se han asociado con cambios en la expresión génica.

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS

La regulación epigenética ocurre a diferentes niveles estructurales que van desde el posicionamiento de los nucleosomas a lo largo los genes hasta la localización de *loci* en el espacio nuclear en función del tipo celular^{18,19}. La expresión de los genes viene determinada por un conjunto de señales intra- y extracelulares. En función de estas señales, los nucleosomas se modifican para permitir el acceso de las proteínas que forman la maquinaria de expresión o, para reprimir la expresión de los genes. Por otro lado, cada una de estas modificaciones de las histonas crean patrones epigenéticos complejos en los *enhancers*, promotores o genes^{20,21}. Estos patrones, heredables y dinámicos, son los que determinan el estado de activación de los genes.

Dentro de todo el conjunto de proteínas que regulan la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas, podemos diferenciar tres tipos generales según su función:

- *Writers*: dentro de este grupo se incluyen a todas las enzimas que introducen modificaciones post-traduccionales en las histonas²². Se han identificado alrededor de 100 enzimas diferentes que añaden distintos grupos químicos, como los grupos acetilo, metilo y fósforo, a los residuos de aminoácidos en la porción amino-

terminal de las histonas. Algunas de estas enzimas, como la lisina-metiltransferasas de histonas (HMTs), son capaces de generar modificaciones multivalentes mediante la adición de uno, dos o tres grupos metilo en residuos de lisina individual²³.

- *Erasers*: de este grupo forman parte las enzimas que eliminan las modificaciones de las histonas. Tienen una función antagónica al grupo anterior. Algunas de estas enzimas son las histonas desacetilasas (HDACs), las histonas desmetilasas (HKMTs) o las fosfatasas de histonas entre otras²⁴. El efecto que produce en la expresión génica depende del tipo de grupo y del residuo. Por ejemplo, en el caso de la acetilación, la eliminación de grupos acetilo produce la compactación de los nucleosomas y, por consiguiente, la represión de la expresión génica²⁵. Algunas de las modificaciones, como fosforilación o acetilación, son muy lábiles, mientras que otras, como la metilación de la lisina, son bastante más estables²⁶.
- *Readers*: son enzimas que llevan a cabo el reconocimiento de los patrones epigenéticos de las histonas modificadas. Este reconocimiento es necesario para la posterior activación selectiva de genes. Junto con las proteínas de la maquinaria de expresión, se forman complejos que se unen a los *enhancers*, promotores y regiones codificantes^{20,21}. La activación de los genes va a depender del patrón epigenético tanto de las histonas como del ADN. Este grupo de proteínas han conservado dominios que son responsables del reconocimiento selectivo de los grupos químicos específicos en las colas de las histonas²⁷. Un ejemplo son los bromodominios que pueden reconocer específicamente residuos lisinas acetiladas²⁸. Estudios recientes han identificado una gran cantidad de sitios en las proteínas que pueden unirse a diversas modificaciones postraduccionales de las histonas, por ejemplo: cromodominios, dedos de Zinc o repeticiones WD (triptófano-aspartato)^{20,21,28}.

De todas las modificaciones que afectan a las colas de las histonas, las más estudiadas son la acetilación, la metilación y la fosforilación pero existen otras como la desiminación, β -N-acetilglucosilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación y sumoilación.

Acetilación de histonas

La acetilación de lisinas en las histonas es un proceso muy dinámico y estrechamente regulado por la acción de dos enzimas con actividades opuestas: las histona acetiltransferasas (HAT) y la histona desacetilasas (HDAC)^{15,25} (fig. 2). Las HAT utilizan Acetil-CoA como cofactor y catalizan la transferencia de un grupo acetilo hasta el grupo ϵ -amino de las cadenas laterales de las lisinas, neutralizando la carga positiva de la lisina, debilitando las interacciones entre las histonas y el ADN²⁵ (fig. 2 y 3) y favoreciendo el acceso de los factores de transcripción y proteínas de la maquinaria expresión génica a la secuencia nucleotídica del ADN. Al igual que muchas otras enzimas modificadoras de histonas, las HAT se encuentran a menudo asociadas en grandes complejos multiproteicos²⁹.

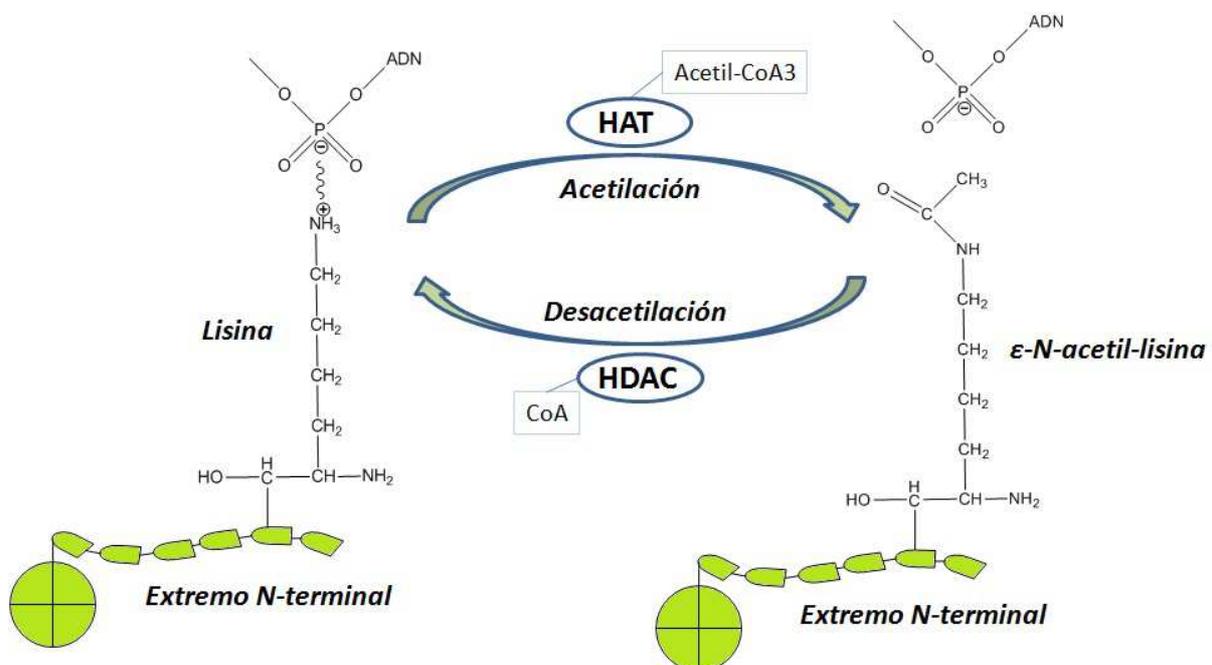


Fig. 2. Esquema de regulación de la acetilación de lisinas en las colas N-terminales de las histonas por HAT y HDAC. Efecto del grupo acetilo sobre la carga de la lisina.

Existen muchos tipos de HMT. En función del tipo de sustrato y de su localización celular, podemos clasificarlas en dos tipos principales:

- *Tipo A:* comprende una familia proteica muy diversa en la que se pueden diferenciar tres grupos dependiendo de la homología de la secuencia de aminoácidos entre

ellas y de la estructura conformacional: familias GNAT, MYST y CBP/p300³⁰. Cada uno de estos grupos modifica múltiples sitios dentro de las colas N-terminales de las histonas y sitios adicionales dentro del núcleo de las histonas globulares, como H3K56³¹.

- *Tipo B*: son HAT predominantemente citoplásmicas, acetilan histonas libres pero no las que están unidas ya a la cromatina. Las HAT tipo B acetilan la histona H4 en los residuos K5 y K12 así como ciertos sitios dentro de la histona H3. Este patrón de acetilación es importante para la disposición de las histonas, después de lo cual las marcadas se eliminan³².

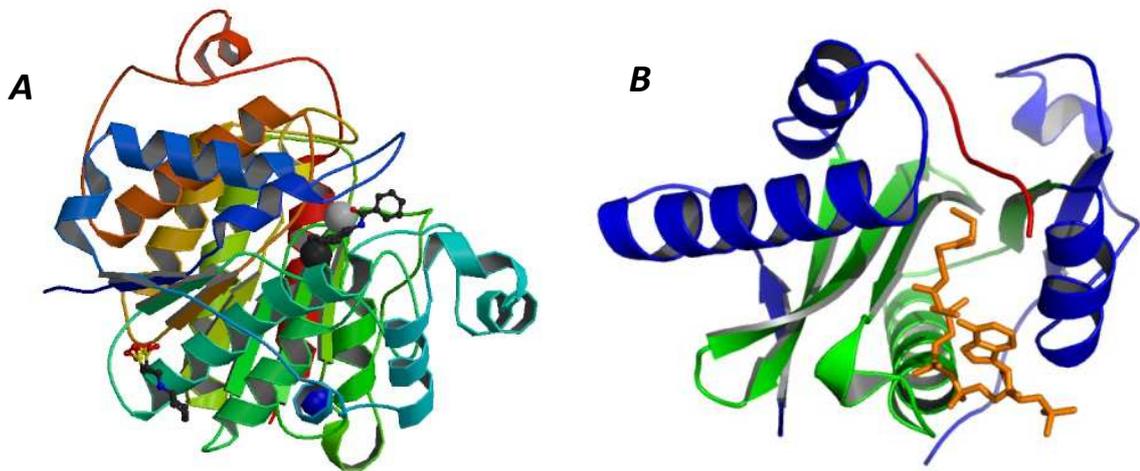


Fig. 3. Estructura tridimensional de A) Histona desacetilasa 2 y B) histona acetiltransferasa.

Las enzimas HDAC tienen la función opuesta a las enzimas HAT, revierten la acetilación de la lisina restaurando la carga positiva de la misma y estabilizando la arquitectura local de la cromatina (fig. 2 y 4). Las proteínas HDAC actúan como represores transcripcionales²⁹.

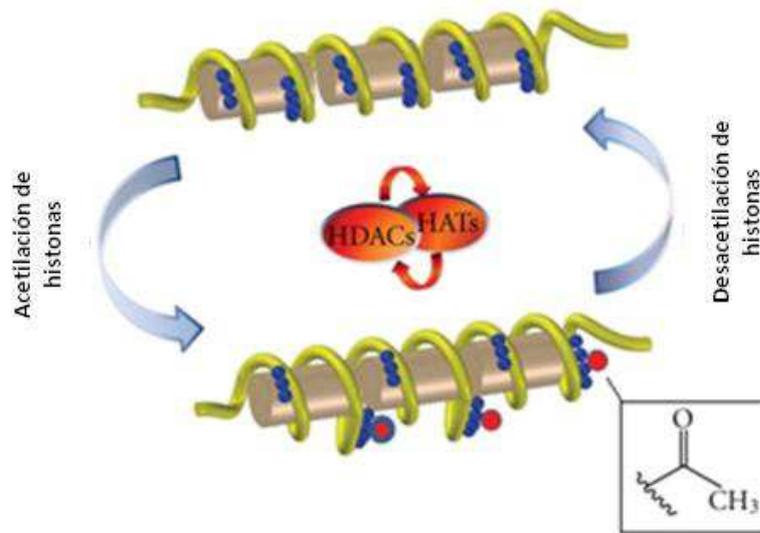


Fig. 4. Representación esquemática de la actividad de las proteínas HAT y HDAC. Modificado de Peserico et al.

Se han identificado 18 HDAC en humanos, que se subdividen en cuatro clases en base a su homología con las HDAC de levadura, su localización subcelular y su actividad enzimática³³. Las HDAC clase I (1, 2, 3 y 8) son homólogas a la proteína de levadura *RPD3*, generalmente se pueden detectar en el núcleo y muestran expresión ubicua en diversas líneas de células y tejidos humanos. Las HDAC Clase IIa (4, 5, 6, 7, 9 y 10) comparten homología con la proteína *Hda1* de la levadura y pueden transportarse entre el núcleo y el citoplasma. La clase HDAC IIb (HDAC6 y 10) se encuentran en el citoplasma y contienen dos dominios desacetilasa. HDAC6 tiene especificidad por un único sustrato, la proteína α -tubulina del citoesqueleto. Posee un dominio específico α -tubulina desacetilasa (TDAC)³⁴ y tiene un importante papel en movilidad celular y metástasis³⁵. A las HDAC clase III se las conoce como Sirtuinas (SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), son homólogas de la proteína de levadura *Sir2* y requieren NAD^+ para su actividad; regulan la expresión génica en respuesta a cambios en el estado *redox* celular. SIRT1 interactúa y desacetila a la proteína p53, lo que reprime la actividad transcripcional mediada por esta proteína. HDAC11 es el único miembro de las HDAC de clase IV; comparte similitud de secuencia con las regiones catalíticas centrales de las clases I y II, pero no tiene una similitud lo suficientemente grande como para ser colocada en cualquiera de las dos familias³⁶ (fig. 5).

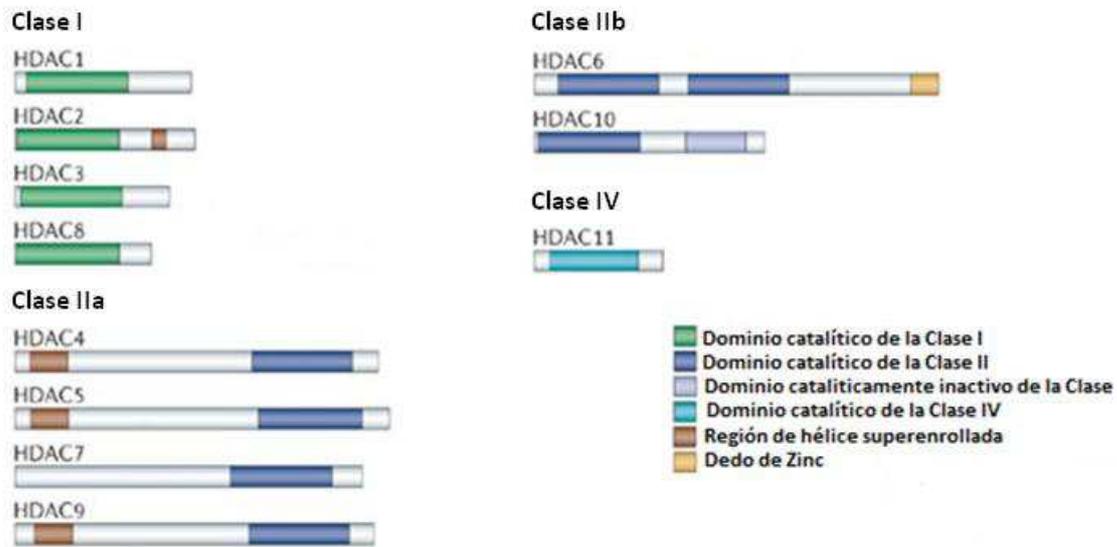


Fig. 5: Familias de proteínas HDAC y dominios. Modificado de Bolden J. E. et al.

Metilación de histonas

La metilación de las histonas se produce principalmente en el grupo amino de las cadenas laterales de lisinas y argininas³⁸. A diferencia de acetilación y fosforilación, la metilación de histonas no altera la carga electroquímica de la histona. En función del residuo que se metila, se activa o reprime la expresión génica. Además, hay un nivel adicional de complejidad a tener en cuenta al considerar esta modificación: las lisinas pueden ser mono-, di- o tri-metiladas, mientras que los residuos de argininas pueden estar mono- o di-metilado simétricamente o asimétricamente^{37,38} (fig. 6 y 7).

- **Metilación de lisina:** Se han identificado numerosas histona-lisina metiltransferasas (HKMTs), la gran mayoría de las cuales metilan lisinas de las colas N-terminales. Todas las HKMTs que metilan lisinas N-terminales contienen un dominio llamado “SET” que alberga la actividad enzimática y tienden a ser relativamente específicas³⁹. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM) al grupo ε-amino de la lisina. Por otra parte, las HKMT también modifican la lisina con un grado específico (es decir, mono-, di- y/o tri-metilación)³⁹ (fig. 6). El grado con el que metilan las distintas HKMT depende de la secuencia de la propia proteína histona-lisina metiltransferasa. Así, por ejemplo, la enzima metiltransferasa DIM5 tiene una fenilalanina (F281) dentro del bolsillo de

unión a lisinas que puede albergar todas las formas metiladas de la lisina, permitiendo de ese modo a la enzima generar el producto tri-metilado⁴⁰. Por el contrario, la proteína SET7/9 tiene una tirosina (Y305) en la misma posición, de tal manera que sólo puede albergar un producto mono-metilado³⁹.

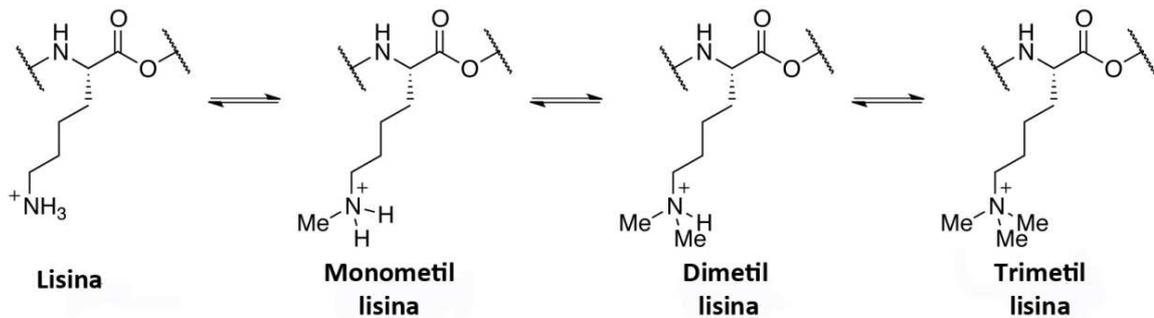


Fig. 6: Lisina y lisina metilada en sus tres estados de metilación

Pero el estado de metilación de las lisinas no solo depende de la secuencia de la enzima metil-transferasa. En términos generales, el grado de accesibilidad a la histona de otras enzimas modificadoras puede influir en el establecimiento de diferentes estados de metilación. Un ejemplo de esto puede ser la conocida vía *trans*-histona por la cual la ubiquitinación de la histona H2B induce la trimetilación de la histona H3 en las lisinas 4 y 79⁴¹. Una explicación sencilla de este proceso es que la ubiquitinación de la histona induce alteraciones sustanciales en la conformación del nucleosoma, lo que aumenta la exposición de la histona H3 en los residuos K4 y en K79 a sus enzimas modificadoras. Del mismo modo, la duración de la exposición de un residuo a su enzima modificadora puede influir en su estado de modificación final⁴¹.

- **Metilación de argininas:** Hay dos clases de arginina metiltransferasa (PRMTs): Las enzimas de tipo I generan argininas con un solo grupo metilo (Rme1) y con dos en distinto grupo amino (Rme2s). Las de tipo II generan Rme1 y dos metilos en el mismo grupo amino (Rme2as)⁴² (fig. 7).

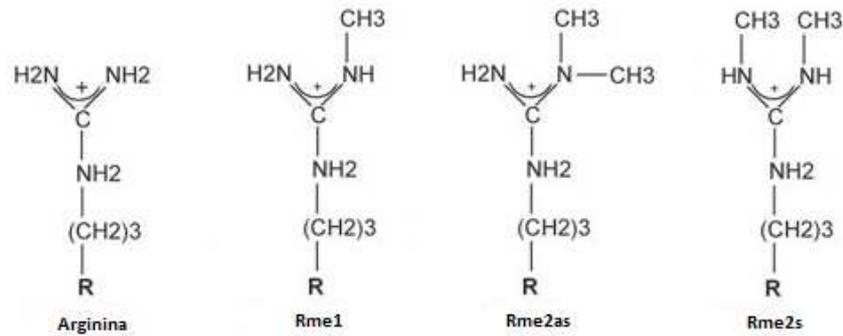


Fig. 7: Arginina y arginina metilada con los distintos sustituyentes

Los dos tipos de arginina metiltransferasas forman una familia de proteínas relativamente grande (11 proteínas) que transfieren un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM) hasta el grupo guanidino de la ω -arginina dentro de una variedad de sustratos.

Desde 2002 se sabe que hay un mecanismo de regulación de la metilación de las histonas mediante un grupo de enzimas desmetilantes tanto de lisina como de arginina⁴². La proteína jumonji (JMJD6) interviene en la desmetilación en las histonas H3R2 y H4R3⁴³. En 2004, se identificó la primera desmetilasa de lisinas que utiliza FAD^+ como cofactor denominándose lisina-específica desmetilasa 1 (LSD1). Este complejo se asocia con la proteína Co-REST que cataliza la oxidación del extremo N-terminal de la Histona 3; la reacción de desmetilación requiere un nitrógeno protonado y, por lo tanto, sólo es compatible con sustratos de lisina mono- y dimetilados⁴⁴. Cuando LSD1 se asocia a Co-REST desmetila H3K4me1/2; sin embargo, cuando forma complejos con el receptor de andrógenos, desmetila H3K9. Este mecanismo dota a LSD1 de la capacidad de regular varias actividades en función del complejo que forme⁴⁵. En 2006, se descubrió otra clase de lisina-desmetilasa que eran capaz de desmetilar lisinas tri-metiladas^{24,46}. Esta nueva clase utilizaba un mecanismo catalítico distinto, empleando Fe^{2+} y α -cetoglutarato como co-factores, y un mecanismo de ataque con radicales. La primera enzima que se identificó como desmetilasa de trimetil-lisinas fue JMJD2 que desmetila H3K9me3 y H3K36me3⁴⁶. Las desmetilasas de lisina tienen un grado de especificidad de sustrato muy alto por su lisina diana. Ahora bien, se ha visto que la actividad enzimática de JMJD2 reside dentro de un dominio JmjC jumonji. Actualmente se conocen muchas más lisina desmetilasas y, a excepción de la LSD1, todas ellas poseen un dominio catalítico jumonji⁴⁷.

Fosforilación de histonas

Al igual que la acetilación, la fosforilación de las histonas es un proceso muy dinámico que tiene lugar en serinas, treoninas y tirosinas, predominantemente en las colas de las histonas N-terminales. Los niveles de fosforilación están controlados por quinasas y fosfatasas que añaden y eliminan residuos de fosfato, respectivamente⁴⁸. Todas las histonas quinasas identificadas transfieren un grupo fosfato a partir de un ATP al grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido de destino, añadiendo una significativa carga negativa a la histona que, sin duda, influye en su estructura, aunque no está claro cuál es el mecanismo que recluta a la enzima histona kinasa a su sitio de acción en la cromatina. La mayoría de los sitios de fosforilación de las histonas se encuentran dentro de las colas N-terminales; sin embargo, no se han descrito sitios de fosforilación en las zonas centrales⁴⁹.

Sobre el papel biológico de las fosfatasas de histonas se sabe menos pero se especula con que dada la extrema velocidad de fosforilación de las histonas específicas, la actividad fosfatasa dentro del núcleo debe ser muy alta⁴⁹.

Desiminación

La desiminación de histonas implica la conversión de una arginina en citrulina. En células de mamíferos esta reacción está catalizada por la peptidil-deiminasa, PADI4, que convierte peptidil-arginina a citrulina⁵⁰. Esta reacción neutraliza la carga positiva de la arginina ya que la citrulina es neutra. También hay evidencias de que la enzima PADI4 convierte metil-arginina en citrulina, con lo que podríamos incluirla también dentro del grupo de desmetilasas de arginina⁵⁰; sin embargo, a diferencia de una verdadera desmetilasa, PADI4 no da lugar a una arginina no modificada con lo cual complica su inclusión en este grupo.

β -N-acetilglucosaminación

Otro mecanismo de modificación de histona es la adición de cadenas laterales de residuos de azúcares β -N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) a residuos de serina y treonina⁵¹. En células de mamíferos sólo hay una enzima, la O-GlcNAc transferasa, que cataliza la transferencia del azúcar del sustrato donante, UDP-GlcNAc, a la proteína diana⁵¹. Como la

mayoría de las modificaciones postraduccionales de las histonas, la modificación O-GlcNAc es también muy dinámica, con una alta tasa de recambio en las histonas. Al igual que en la reacción de adición de O-GlcNAc, no parece que haya sólo una única enzima capaz de eliminar el azúcar, β -N-acetilglucosaminidasa (O-GlcNAcase), pero aún no se han descrito más en mamíferos. Hasta el momento, se ha demostrado que solo las histonas H2A, H2B y H4 son modificadas por O-GlcNAc⁵¹.

ADP ribosilación

Desde hace algún tiempo se sabe que las histonas pueden ser mono- y poli-ADP ribosiladas de manera reversible en residuos de glutamato y arginina, pero se sabe relativamente poco sobre la función de esta modificación⁵². La poli-ADPribosilación es llevada a cabo por la familia de enzimas poli-ADPribosa polimerasas (PARP) y revertido por la familia de enzimas poli-ADP-ribosa-glicohidrolasa. Estas enzimas funcionan juntas para controlar los niveles de histonas poli-ADP-ribosiladas, lo que se correlaciona con un estado relativamente relajado de la cromatina⁵², consecuencia, al menos en parte, de la carga negativa que esta modificación confiere a la histona. En trabajos recientes se ha visto que la activación de PARP-1 produce niveles elevados de histonas acetiladas, lo que apoya la teoría de que se mantiene la cromatina relajada, pero no está claro si es por la presencia de grupos acetilo o por la ribosilación⁵². La mono-ADP-ribosilación de las histonas se lleva a cabo por la proteína mono-ADP-ribosiltransferasas y se ha detectado en las cuatro histonas del nucleosoma así como en la histona H1. En particular, estas modificaciones aumentan significativamente tras daños en el ADN, lo que implica a este mecanismo en la vía de respuesta a daño del ADN⁵².

Ubiquitinación y sumoilación

Todas las modificaciones de las histonas descritas anteriormente producen pequeños cambios moleculares en las cadenas laterales de aminoácidos; sin embargo, los cambios que resultan de una ubiquitinación son modificaciones covalentes de mayor magnitud. La ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos que se une a las lisinas de las histonas a través de la acción secuencial de tres enzimas, E1 que activa, E2 que conjuga y E3

que produce la ligación (fig. 8)⁵³. Los complejos enzimáticos determinan tanto el sustrato (muestra cual es la lisina diana), como el grado de ubiquitinación (define que sea mono o poliubiquitinilado). Para las histonas, la mono-ubiquitinización parece ser el grado más frecuente, aunque, actualmente, no podemos determinar aún cuales son todos los sitios exactos de modificación. Sin embargo, hay dos sitios bien caracterizados dentro de H2A y H2B. H2AK119ub1 está involucrado en el silenciamiento de genes⁵⁴, mientras que H2BK123ub1 juega un importante papel en la iniciación de la transcripción y la elongación⁵⁵. A pesar de que la ubiquitinación es una modificación muy grande, también es altamente dinámica, añadiendo y eliminando grupos ubiquitina constantemente. La ubiquitinización se elimina a través de la acción de isopeptidasas llamadas enzimas desubiquitinas, cuya actividad es importante tanto para la actividad de los genes como para el silenciamiento.

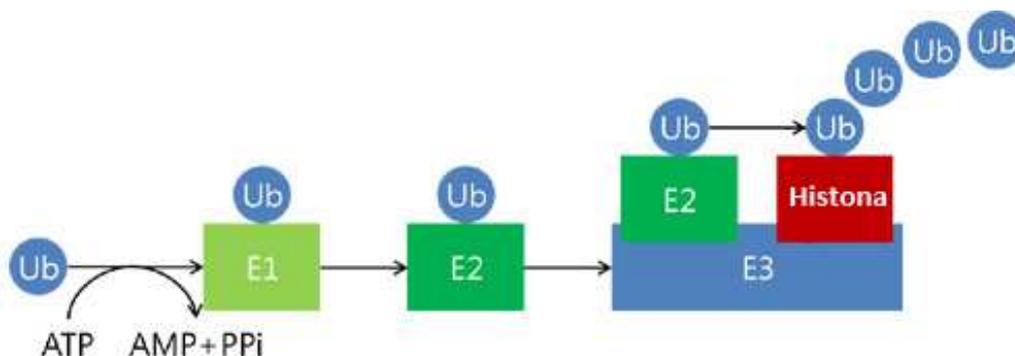


Fig. 8: Resumen esquemático de la ruta de ubiquitinación de las histonas. Modificado de Pickart and Eddins, 2004

La sumoilación está relacionada con la ubiquitinización y consiste en la unión covalente de unas pequeñas moléculas modificadoras de unos 100 aminoácidos, similares a la ubiquitina, llamadas grupo SUMO, a las lisinas de las histonas a través de la acción de las enzimas E1, E2 y E3⁵⁶. Se ha detectado presencia de sumoilación en el núcleo de cuatro histonas y parece funcionar mediada por una acetilación y ubiquitinización antagónicas ya que de otro modo podrían producirse en la misma cadena lateral de lisina. Por consiguiente, se ha asociado principalmente con funciones represivas, aunque se necesitan más estudios para comprobar cuales son los efectos que ejercen sobre la cromatina⁵⁷.

METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN es un proceso que implica la adición de un grupo metilo al nucleótido citosina. Este proceso es capaz de altera de manera estable la expresión de los genes, provocando su silenciamiento. Es un proceso fisiológico que ocurre en todas las células implicado en mantener los diferentes patrones de silenciamiento génico en función del tipo celular o del estadio de la vida de la célula^{58,59}.

La metilación del ADN es un proceso heredable entre las distintas generaciones celulares. En la embriogénesis se elimina durante la formación de cigoto, pero se restablece a través de las sucesivas divisiones celulares durante el desarrollo^{60,61}. Los patrones de metilación génica aberrantes son también heredables, lo que puede llevar a la transmisión vertical de fenotipos patológicos entre las distintas generaciones. La metilación del ADN también juega un papel crucial en el desarrollo de casi todos los tipos de cáncer⁶².

En mamíferos la metilación del ADN tiene lugar en las regiones conocidas como islas CpG. Estas son secuencias ricas en citosinas y guaninas que se encuentran con mayor frecuencia en los promotores y en los *enhancers* de genes. Las enzimas que llevan a cabo la metilación son las ADN metiltransferasas (DNMTs) e introducen un grupo metilo en el carbono 5 del anillo de citosina. La presencia masiva de este grupo metilo impide el reconocimiento de las secuencias diana por parte de las proteínas de expresión génica, con lo que se consigue la represión de la transcripción.

Todas las DNMTs tienen una estructura similar, pero la más importante es la DNMT1 (fig. 9), que posee dos regiones bien diferenciadas: en el extremo N-terminal presenta dos motivos de unión a las proteínas DMAP1 y PCNA que regulan actividad de la proteína; el motivo NLS, que es una región señal de localización nuclear y el motivo RFTS, que tiene como función la asociación a otras proteínas, localización subcelular y dominio regulador⁶³. Una región CXXC, que es un dedo de zinc que reconoce islas CpG⁶⁴; y dos dominios BAH ricos en bromo con función de asociación a otras proteínas del complejo de metilación⁶⁵, siendo conocidos estos dominios como PBHD (*polybromo homology domain*).

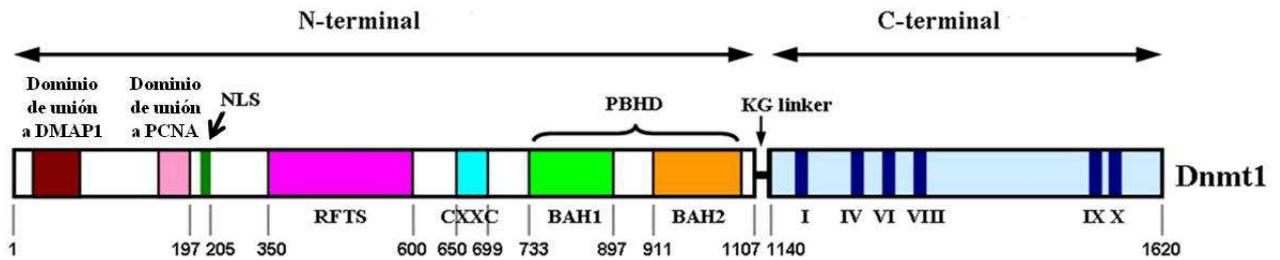


Fig. 9: Estructura de la proteína DNMT1. Modificado de Ryazanova et al. 2013

Entre las regiones N-terminal y C-terminal existe una zona de unión rica en lisinas y glicinas llamada *KG-linker*. El extremo C-terminal comprende el dominio catalítico y presenta un conjunto de sitios conservados filogenéticamente a lo largo de la evolución^{63,64}.

Todas las metiltransferasas de ADN utilizan la coenzima S-adenosil-L-metionina (AdoMet) como la fuente del grupo metilo que se transfiere al ADN, dando lugar a un grupo S-adenosil-L-homocisteina (AdoHcy)⁶⁶ (fig. 10). Una o ambas hebras del ADN son susceptibles de metilación. El grupo metilo introducido se localiza en el surco mayor de la doble hélice, lo que no perturba la estructura de Watson y Crick.

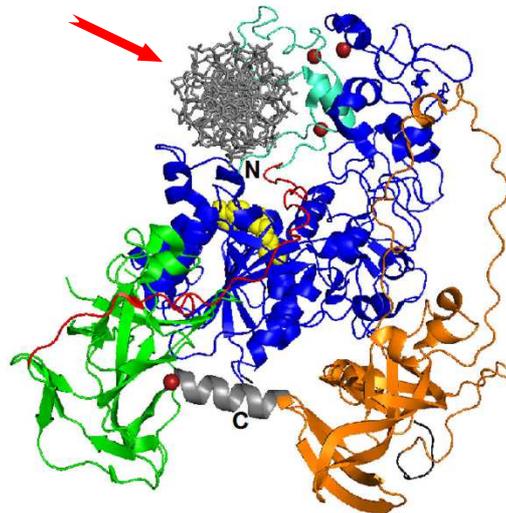


Fig. 10: Estructura tridimensional de la DNMT1 acoplejando a la coenzima S-adenosil-L-metionina (flecha roja). Modificado de Ryazanova et al. 2013

El mecanismo catalítico de acción de las metiltransferasas de ADN es complejo e implica tanto una catálisis covalente como una ácido/básica (catálisis en presencia de H^+ u OH^-). En AdoMet, el grupo metil está enlazado a un átomo de azufre cargado, que desestabiliza la molécula termodinámicamente y hace que el grupo reactivo metilo realice

un ataque nucleofílico. Sin embargo, puesto que la posición de C5 de la citosina no tiene nucleofilicidad suficiente, el anillo de citosina tiene que ser activado por la enzima para permitir la transferencia del grupo metilo. Una característica clave de este proceso es el ataque nucleofílico de la enzima en el carbono 6 de la citosina diana llevado a cabo por el grupo *tiol* del residuo de cisteína del motivo IV de la enzima (fig. 11). La formación de este enlace covalente conduce a la generación de una alta densidad de electrones en la posición C5, permitiendo un ataque nucleofílico por el grupo metilo de la coenzima AdoMet. El ciclo de reacción se termina mediante la desprotonación de la posición C5 y la eliminación del residuo de cisteína⁶⁷(fig. 11).

La metiltransferasa de ADN está disponible para realizar una ronda de metilación después de intercambiar la coenzima desmetilada por la metilada. La naturaleza de la base responsable de la desprotonación de la posición C5 no se conoce; podría ser un resto de arginina situado en motivo VIII o un grupo fosfodiéster de la del ADN, implicados ambos en la reacción anterior, pero no está claro⁶⁷.

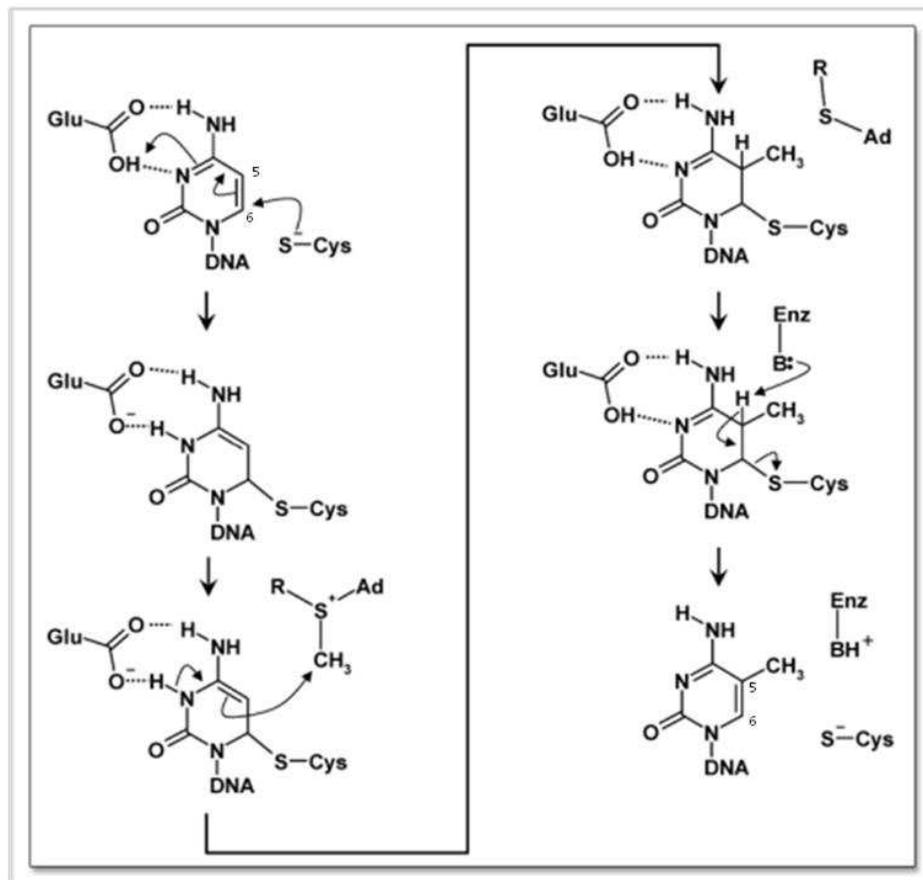


Fig. 11: Mecanismo de acción de la Dnmt1 sobre un residuo de citosina. Modificado de Gowher et al. 2004

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE miARNs

Los microARN (miARN) son una familia ARN de 21-25 nucleótidos de longitud que se expresan en una amplia variedad de organismos que van desde las plantas hasta los gusanos y seres humanos. Muchos miARNs están muy conservados entre especies⁶⁸, incluso se han encontrado varios componentes de la maquinaria de miARN en arqueas y eubacterias. En el último recuento de miARN humanos, el número ascendió a 900 miARNs (datos de <http://www.mirbase.org>), lo que representa más de un 3% de todos los genes humanos⁶⁹. Inicialmente fueron descritos en *Caenorhabditis elegans*, pero ahora sabemos que están involucrados en una amplia variedad de procesos de desarrollo y tienen un papel crucial en la red de regulación de la expresión génica de la célula⁶⁸. Con la gran cantidad de miARNs que se conocen y las múltiples dianas que regulan muchos de ellos, es fácil de deducir que existe una compleja red de regulación mediante miARNs en la célula. Los miARNs son pequeños ARN interferentes que se generan a partir de precursores específicos en el genoma y que al transcribirse se pliegan en horquillas al presentar regiones con complementariedad interna. El procesamiento de los precursores es catalizado por dos enzimas, DROSHA en el núcleo y DICER en el citoplasma. Una de las hebras del miRNA (la hebra 'antisentido') se incorpora al complejo RISC⁷⁰. Dependiendo del grado de complementariedad del miARN con el ARNm, los miARN pueden bien inhibir la traducción del ARNm o bien inducir su degradación⁷⁰.

Otra vía que utiliza los pequeños ARNs como reguladores de secuencia específicas es la vía de interferencia de ARN (ARNi). Los ARN de doble cadena se escinden por la enzima DICER en dúplex de unos 20 pares de bases de pequeños ARNs interferentes (siARNs) perfectamente complementario con 2 nucleótidos desemparejados en cada extremo 3'. Una de las hebras del siARN (la hebra 'antisentido') se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (RNA-induced silencing complex), que utiliza la hebra de siARN como guía para identificar el ARN mensajero complementario⁷¹. Estos siARNs posteriormente llevan a la represión de aquellos ARNm diana con complementariedad perfecta.

Biogénesis de miARNs

Los miARNs se transcriben desde diferentes lugares del genoma como transcritos primarios (pri-miARN) por la ARN-polimerasa II⁷². En muchos casos los genes que se transcriben a miARNs están agrupados en familias transcripcionales policistrónicas para permitir la expresión coordinada⁷². Existen grupos de miARNs específicos de tejido y otros que se expresan en etapas concretas del desarrollo. En los últimos años se ha demostrado que los factores de transcripción son imprescindibles para la regulación de la expresión de miARNs⁷³.

Después de la transcripción, los miARNs primarios son procesados por la acción sucesiva de dos miembros de la familia de enzimas RNasa III, Drosha y Dicer. Estas enzimas forman complejos con otras proteínas compartiendo el dominio de unión a ARN de doble cadena (dsRBD). La enzima Drosha forma, a partir de pri-miARN, un precursor de unos 70 nucleótidos llamado *pre-miARN* que se puede plegar dando lugar a un tallo con una estructura en bucle que contiene diversos desapareamientos. El pre-miARN es transportado hacia el citoplasma por la proteína Exportin-5, que es una proteína Ran-GTP dependiente. En el citoplasma, el pre-miARN es escindido por Dicer para generar un dúplex de 20pb intermedio⁷⁰. EL miARN maduro se encaja en los complejos efectores llamados miRNPs (miARN que contienen partículas ribonucleoprotéicas) que comparten muchas similitudes con el complejo RISC. La única proteína que se encuentra constantemente en el complejo RISC y miRNP es Argonata (AGO) altamente conservada⁷⁴ que forma parte de los complejos de unión a la secuencia diana, teniendo un papel fundamental en el silenciamiento⁷⁴.

Una vez que el miRNP está ensamblado, el miARN guía el complejo a su objetivo por el apareamiento de bases con el ARNm diana. En el mundo animal, la mayoría de los miARNs se unen a múltiples sitios por complementariedad parcial en el sitio 3'-UTR; sin embargo, las secuencias insertadas en la región 5'-UTR son también funcionales⁷⁵. Si la complementariedad es perfecta o casi perfecta el miARN dirigirá la destrucción del ARNm⁷⁶, pero si la complementariedad de los miARN con el ARNm diana es parcial, se producirá la inhibición de la expresión de la proteína sin afectar a los niveles de ARNm, aunque los

últimos hallazgos indican que este último caso no está del todo claro y sí podría existir una disminución de los niveles de ARNm⁶⁸ (fig. 12).

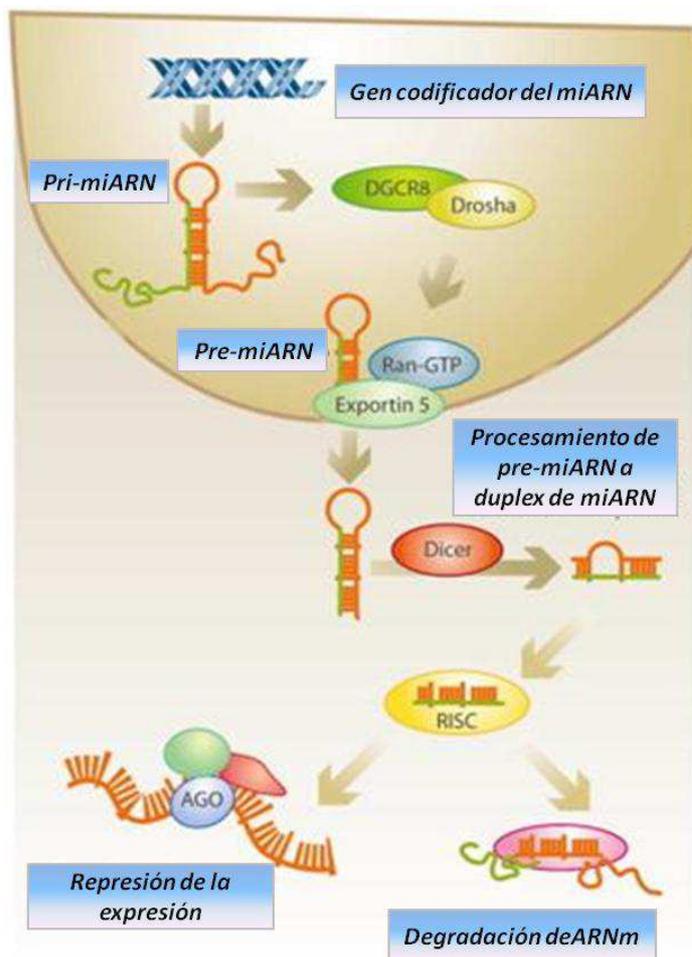


Fig. 12: Biogénesis de miARN. Los pri-miARN son procesados por la enzima Drosha dando lugar a un pre-miARN. Este es transportado al citoplasma y ahí es procesado por DICER dando lugar a un miARN maduro. Este miARN maduro se asocia al complejo RISC y en función de la complementariedad con el ARNm diana, el control ejercido será inhibición de expresión del ARNm o degradación de este. Modificado de Timothy W. Bredy et al. 2011

Cualquier fallo en la regulación de la expresión génica por miARNs podría dar lugar a grandes trastornos en la célula. La sobreexpresión de genes que codifican miARNs puede llevar al incremento del número de copias de miARNs con el consiguiente incremento del silenciamiento y degradación de ARNm en los genes supresores de tumores (fig. 13). Si lo que se produce es sobreexpresión de un oncogén, el número de copias del miARN que lo regula puede no ser suficiente, favoreciéndose la hiperexpresión (fig. 13). Estos dos casos pueden inducir el desarrollo de fenotipos cancerosos. De hecho, se ha demostrado que los perfiles de miARNs se modifican en un gran número de cánceres⁷⁷, como que la sobre- e infraexpresión en el laboratorio de miARNs puede llevar al desarrollo de tumores⁷⁸ (fig. 13).

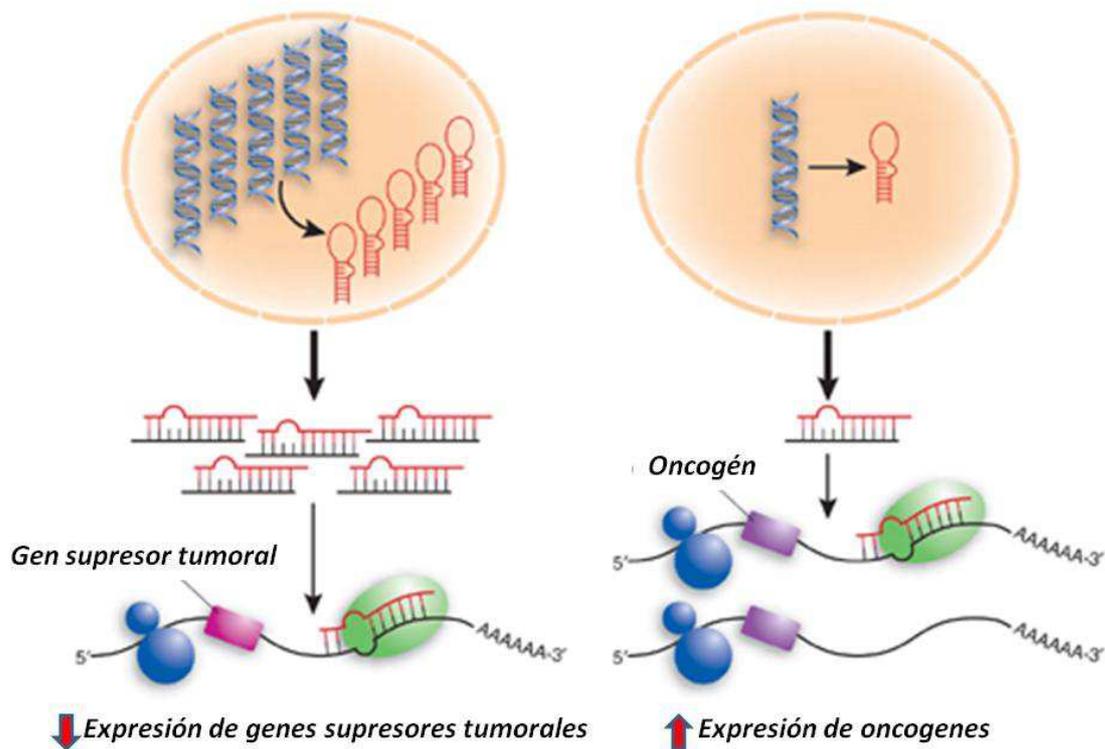


Fig. 13: Desregulación del control de la expresión génica mediante miARNs. Modificado de Caldas et al.2005

MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS Y TUMOROGÉNESIS

El daño en el ADN, la mutación, es la principal causa de desarrollo del cáncer. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que hay otro mecanismo íntimamente relacionado con el desarrollo del cáncer que no implica directamente daño en la secuencia de nucleótidos. A nivel puntual, el daño en la secuencia de nucleótidos puede provocar una expresión aberrante de oncogenes y de genes supresores de tumores. Sin embargo, a nivel más global en toda la cadena de ADN, también las modificaciones de las histonas pueden afectar a la integridad del genoma y/o la segregación cromosómica⁷⁹.

En las células existen inhibidores intrínsecos que controlan los niveles tanto de proteínas HDAC como de HMT⁸⁰ y parece claro que la modificación aberrante de los perfiles de regulación epigenéticos de las histonas están íntimamente relacionados con el desarrollo de cáncer⁷⁹. Sin embargo, a diferencia de las mutaciones en el ADN, los cambios en el epigenoma asociados con el cáncer son potencialmente reversibles, lo que abre la

posibilidad de desarrollar *fármacos epigenéticos* que podrían tener un fuerte impacto dentro de los protocolos de tratamiento de diversos tipos de cáncer. De hecho, se ha encontrado que los inhibidores de HDAC son particularmente eficaces en la inhibición de crecimiento o proliferación de tumores, la activación de la apoptosis e inducción de la diferenciación, al menos en parte mediante la reactivación de ciertos genes supresores de tumores⁷⁹. Diversos inhibidores de enzimas modificadoras de histonas, como los inhibidores de HDAC o de HMT, están actualmente en desarrollo, aunque hay controversias. Por otra parte, la FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado recientemente su uso terapéutico contra varios tipos específicos de cáncer, entre ellos el Linfoma cutáneo de células T. Otros compuestos se encuentran actualmente en fases II y III de ensayos clínicos⁸¹.

No se entiende completamente cual es el mecanismo de acción de los inhibidores de HDAC y, además, la mayoría de los inhibidores de HDAC no son específicos de enzima, es decir, inhiben una amplia gama de HDAC. Se los conoce como pan-inhibidores. Por tanto, en el desarrollo de nuevos inhibidores tanto para HDAC como para HMT, se debe considerar el desarrollo de inhibidores específicos de enzima, inhibidores de subfamilias enzimáticas específicas, o de manera similar a los inhibidores de HDAC, pan-inhibidores^{79,81}.

Inhibidores de HDAC endógenos

La célula tiene sus propios inhibidores de proteínas HDAC para mantener los niveles correctos de acetilación. Además, se han descrito varias proteínas de fusión oncogénicas que muestran una ganancia de función debido a un reclutamiento aberrante de las proteínas HDAC⁸⁰.

Existe un número de genes supresores tumorales cuya pérdida de función está relacionada con la tumorigénesis y que fisiológicamente protegen a la célula de una actividad aberrante de HDAC⁸⁰. Un ejemplo de estos genes es HIC1 (*Hypermethylated in cancer 1 protein*). La expresión de este gen viene regulada por la metilación o la desmetilación de su promotor. La proteína HIC1 se encuentra unida a un sitio regulador de sirtuina (SIRT) siendo, por tanto, un supresor tumoral que regula a las proteínas HDAC de

clase III. En respuesta a daño en el ADN o a estrés genotóxico, HIC1 es capaz de liberarse de SIRT induciendo su expresión⁸⁰. Esta SIRT inducida desacetila a p53 y lo activa produciendo una cascada de reacciones que lleva a la expresión de genes de parada de ciclo celular y de apoptosis. En una situación patológica, si el gen HIC1 está hipermetilado no se produce la síntesis ni la activación de HIC1. En esta situación, no habría respuesta p53 por esta vía y, por tanto, se incrementaría el riesgo de descontrol de la proliferación⁸⁰ (fig. 14). Existen varios tipos de proteínas supresoras tumorales que controlan la expresión y actividad de HDAC y cuyo descontrol puede dar lugar a situaciones patológicas⁸².

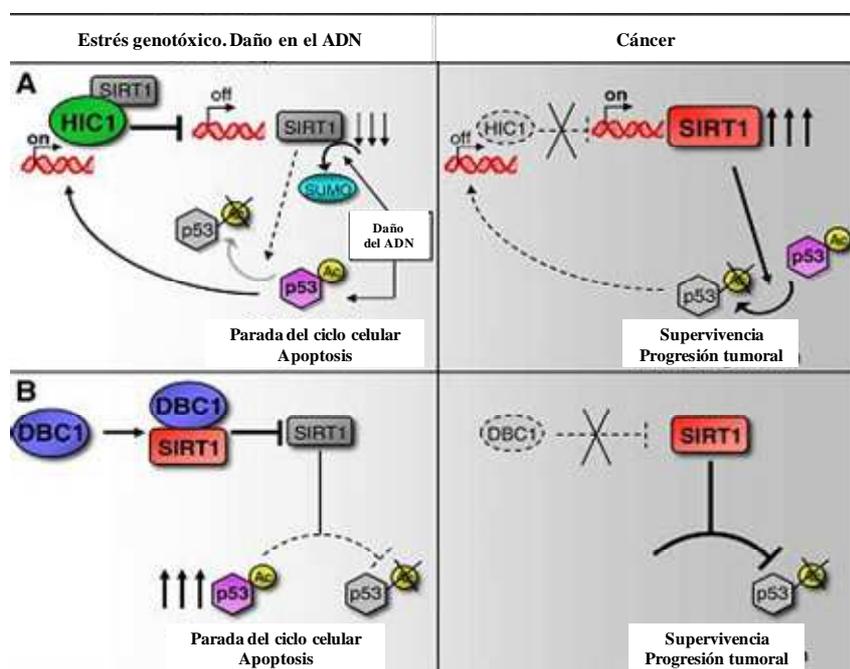


Fig. 14: Activación de HIC1 en situación normal y patológica en respuesta a daño. Di Marcotullio et al. 2010

NUEVOS FÁRMACOS REGULADORES DE LA ACTIVIDAD EPIGENÉTICA

Proteínas HDAC como posibles dianas terapéuticas

En los últimos años se ha visto que las proteínas HDAC son dianas prometedoras de nuevas estrategias terapéuticas que intentan revertir estados epigenéticos aberrantes asociados con cáncer; en consecuencia, se ha dedicado un importante esfuerzo para desarrollar inhibidores de HDAC (HDACi)^{82,83}. Estudios preclínicos han encontrado varios tipos de HDACi con potentes actividades antitumorales, con una elevada especificidad y que,

en algunos casos, con un potencial terapéutico prometedor en enfermedades hematológicas tales como linfoma cutáneo de células T, síndromes mielodisplásicos y linfoma difuso de células B⁸⁴.

Los primeros estudios han proporcionado información importante acerca de la actividad *in vitro* e *in vivo* de HDACi y han planteado preguntas sobre los mecanismos moleculares que subyacen en sus efectos antitumorales, incluyendo cómo matan a las células tumorales y cómo las células tumorales pueden eludir la muerte celular inducida por los HDACi^{82,83}.

La gran mayoría de los estudios han demostrado que estos agentes inducen cambios morfológicos en la célula característicos de la apoptosis⁸⁵. Además, se ha visto que, a parte de sus efectos intrínsecos sobre las células tumorales, los HDACi también afectan al crecimiento neoplásico, a la supervivencia celular modulando la respuesta inmune y a la regulación de la vasculatura tumoral^{71,86}.

Los cambios epigenéticos relacionados con el cáncer pueden afectar a todo el genoma o estar más restringidos e incluir la expresión o activación alterada de una proteína de regulación epigenética, proporcionando una base sólida para el uso de terapias basadas en la epigenética como son los HDACi^{79,87}. Hasta la fecha, varios estudios se han centrado en analizar cómo actúan las proteínas HDAC, cómo regulan a las proteínas responsables de la expresión génica y qué ocurre cuando su función desacetilasa está alterada⁸⁸⁻⁹⁰. Existen varios ejemplos de tumores en los que se ha visto que existe una expresión alterada de algunas HDAC. Por ejemplo, HDAC1 se sobreexpresa en cáncer de próstata⁹¹, cáncer gástrico⁹², cáncer de colon⁹³ y de mama⁹⁴; HDAC2 se sobreexpresa en cáncer colorrectal⁹⁵, cervical⁹⁶ y cáncer gástrico⁹⁷.

En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que la modificación de la expresión de proteínas HDAC podría tener un papel activo en el inicio del tumor y la progresión, y abre la posibilidad de ver a las proteínas HDAC como un objetivo para la intervención terapéutica.

Tipos de inhibidores de HDAC

Los inhibidores de HDAC (HDACi) disponibles hasta el momento, se han purificado a partir de fuentes naturales o se han sintetizado en el laboratorio y al menos once de ellos han progresado hasta el desarrollo clínico. Los HDACi se pueden dividir en seis clases sobre la base de su estructura química^{83,89,98} (fig. 15):

- Ácidos grasos de cadena corta
- Derivados del hidroxamato
- Derivados de Benzamida
- Tetrapéptidos cíclicos
- Cetonas electrofílicas
- Otras sustancias no incluidas en las anteriores categorías

En la actualidad, los estudios están centrados en conseguir proteínas HDAC purificadas para desarrollar nuevos compuestos más específicos, algo que hasta ahora ha sido bastante complicado debido a la dificultad para producir dichas proteínas⁹⁹.

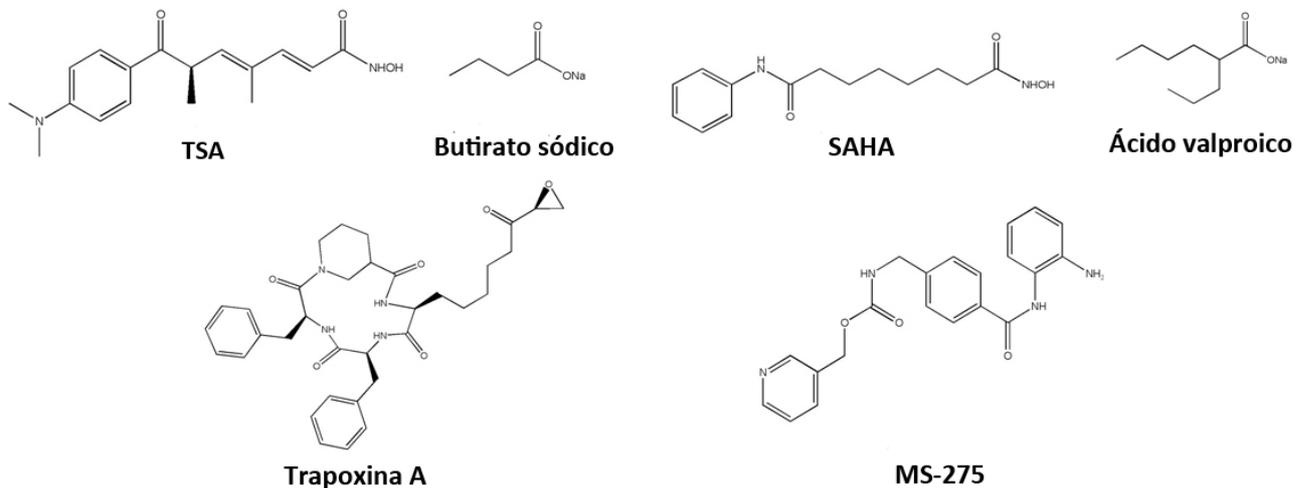


Fig. 15: Ejemplos de inhibidores de histona desacetilasas. El butirato sódico y el ácido valproico derivan de ácidos grasos de cadena corta. TSA y SAHA derivan del ácido hidroxámico. Trapoxina deriva de tetrapéptidos cíclicos. MS-275 deriva de la benzamida. Modificado de Chittur et al. 2008

Ciertos HDACi pueden inhibir selectivamente las HDAC, como se ha comprobado al evaluar el efecto de los HDACi en la hiperacetilación de las histonas H3 o H4 y α -tubulina, las cuales actúan como marcadores de la actividad de HDAC6¹⁰⁰. El inhibidor específico de HDAC6, *Tubacin*, induce hiperacetilación de la α -tubulina y no tiene ningún efecto sobre el estado de acetilación de histonas¹⁰¹; sin embargo, otros HDACi, como por ejemplo los derivados del hidroxamato, suelen inducir hiperacetilación de histonas H3 y H4.

Los efectos biológicos que producen los inhibidores de HDAC sobre la célula dependen del tipo de inhibidor y se dividen en 4 clases:

- Inducción de apoptosis: El potencial terapéutico de los HDACi radica en su capacidad para inducir la apoptosis selectiva de las células del tumor. Aunque los HDACi pueden afectar a las células tumorales, los mecanismos moleculares a través de los cuales se modifican las vías que inducen las respuestas al tratamiento siguen en estudio. Dada la pleiotropía biológica de los efectos de los HDACi, es poco probable que una sola vía molecular sea capaz de conducir a la muerte celular, más bien parece que los efectos de los HDACi dependen del tipo celular y que los distintos HDACi tienen efectos diversos en un mismo tipo celular¹⁰².
- Activación de vías por receptores de muerte extrínsecos: Un gran número de estudios han demostrado que los receptores de la familia de TNF (factor de necrosis tumoral) y sus ligandos son activados transcripcionalmente tras el tratamiento con HDACi¹⁰³.
- Activación de vías de muerte mitocondriales: Un gran número de estudios independientes apoyan el papel de la vía mitocondrial en la muerte de células tumorales tras el tratamiento con HDACi^{104,105}. Esta vía se ejecuta en respuesta a señales externas y a daño en el ADN. Muchas vías de respuesta convergen en la mitocondria, a menudo a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl2¹⁰⁶. La activación de estas proteínas proapoptóticas puede producirse a través de proteólisis, desfosforilación y otros mecanismos como la desacetilación

de proteínas por HDAC específicas. Esta ruta preapoptótica desencadena la liberación de una gran cantidad de moléculas desde la mitocondria, principalmente el Citocromo C, que se asocia con la proteína APAF-1 y después con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 que se encarga de ejecutar la apoptosis generando distintos subprogramas cuya suma resulta en la muerte controlada de la célula^{38,39}.

- Parada de ciclo celular: Los HDACi se descubrieron principalmente por su capacidad para inducir la diferenciación celular, efecto que está íntimamente asociado con la detención del ciclo celular en el límite G1/S en algunas líneas celulares¹⁰³. Sin embargo, los HDACi pueden mediar también en la detención del ciclo en fase G2/M mediante la activación del punto de control de mitosis de la fase G2. En ciertas circunstancias, la pérdida del punto de control de la fase G2 puede llevar a una muerte apoptótica en presencia de los HDACi. No obstante, las células que no tienen defectos en el punto de control de G2 son resistentes a los efectos de HDACi¹⁰⁷.

***Panobinostat®*, inhibidor de HDAC**

Los inhibidores de HDAC han experimentado un rápido desarrollo, siendo utilizados en ensayos clínicos en Fases I-III. Entre los pan-inhibidores de HDAC, el Vorinostat® es, en la actualidad, el más ampliamente estudiado y ya ha recibido la aprobación de la FDA para el tratamiento de linfomas cutáneos de células T^{86,108,109}.

Más recientemente, se ha comunicado que el derivado de ácido hidroxámico pan-inhibidor de HDAC, Panobinostat® o *LBH589* (fig. 16) tiene una prometedora actividad como agente anticancerígeno. Panobinostat® tiene una fuerte actividad inhibidora a nivel de nanomolar de todas las clases de proteínas HDAC recombinantes purificadas¹¹⁰. En estudios previos de actividad enzimática, el Panobinostat® ha mostrado unos valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria media máxima) de rango bajo (de nivel nanomolar) para todas las proteínas HDAC (tabla 1)¹¹⁰.

Tabla 1: Perfil de actividad de panobinostat®. P. Atadja 2009

Inhibición de la actividad enzimática <i>IC</i> ₅₀ (nM)	Panobinostat (LBH589)
HDAC1	2.5
HDAC2	13.2
HDAC3	2.1
HDAC4	203
HDAC5	7.8
HDAC6	10.5
HDAC7	531
HDAC8	277
HDAC9	5.7
HDAC10	2.3
HDAC11	2.7

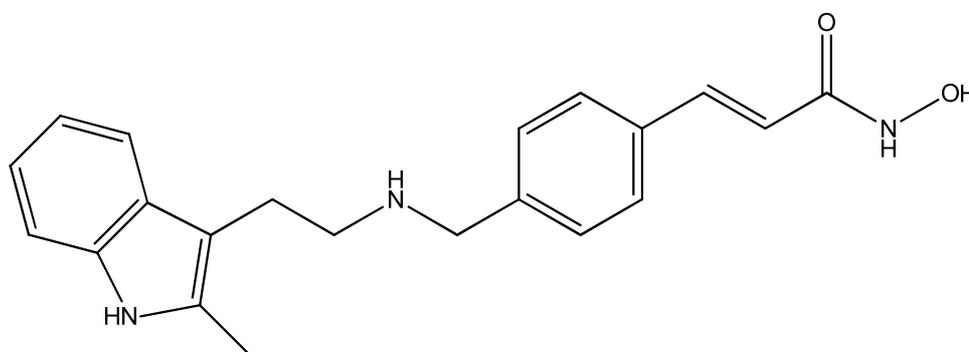
**Panobinostat®
(LBH589)**

Fig. 16: Fórmula química del Panobinostat® (LBH589). (2E)-N-hidroxi-3-[4-([2-(2-metil-1H-indol-3-yl)etil]amino)metil]fenil]acilamida. La molécula consta de un grupo indol metilado en la posición 2 y 3 y unido a un grupo fenilo a través de una amina secundaria. El fenil contiene un grupo acrilamida, en el carbono para, modificada en el nitrógeno por un grupo hidroxilo. Este último sustituyente corresponde con el ácido hidroxámico.

De todos los pan-inhibidores de HDAC, Panobinostat® ha demostrado ser el más potente entre aquellos que están en desarrollo, superando hasta en 10 veces al Vorinostat®¹¹⁰.

En consonancia con la fuerte inhibición de proteínas HDAC, Panobinostat® ha mostrado una fuerte actividad antiproliferativa y citotóxica en una gran variedad de líneas celulares de cáncer mientras que esta toxicidad se ve muy reducida al realizar ensayos con células normales¹¹⁰. Utilizando concentraciones muy bajas de Panobinostat®, se induce la inhibición del crecimiento y citotoxicidad celular del linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), Linfoma de Hodgkin, y líneas celulares derivadas de cáncer de mama, próstata, colon y páncreas¹¹⁰.

Aunque el efecto antitumoral *in vitro* de Panobinostat® está demostrado en todas las líneas celulares tumorales estudiadas, se han observado sensibilidades diferentes en cuanto a mortalidad celular. En especial, las células normales (células epiteliales mamarias humanas y renales) se muestran particularmente resistentes a la citotoxicidad del *LBH589*, indicando que Panobinostat® podría inducir citotoxicidad específica en células tumorales¹¹⁰.

En comparación con otros inhibidores de desacetilasas, Panobinostat® ha demostrado una mayor capacidad antitumoral en cultivos celulares. Por ejemplo, en las líneas celulares *HCT116*, *BT474* y de linfoma cutáneo de células T (CTCL), Panobinostat® inhibió la proliferación y la viabilidad celular con concentraciones hasta 100 veces más bajas que las concentraciones de los inhibidores *MGCD0103* y *Vorinostat®* mostrando un buen balance entre las concentraciones de Panobinostat® necesarias para la inhibición de HDAC y la actividad antiproliferativa (IC_{50} para la inhibición de HDAC y la actividad antiproliferativa: 2 - 530nM y 1.8 - 15,9 nM, respectivamente)⁸³.

Agentes hipometilantes. Nuevas estrategias de tratamiento anticancerígeno

Como ya se ha mencionado anteriormente, la metilación del ADN es una modificación química covalente que ocurre en los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG. Las enzimas ADN metil-transferasas (DNMTs) catalizan la metilación del genoma, aunque también están asociadas con enzimas modificadoras de histonas (por ejemplo, histonas desacetilasas), con histonas-metiltransferasas y con enzimas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP. La metilación del ADN es una marca epigenética estable que regula la estructura de la cromatina y la expresión de genes implicado en procesos muy heterogéneos¹¹¹.

Diversos estudios han demostrado que en muchos tipos de tumores existen cambios en la metilación, incluyendo hipometilación global del genoma e hipermetilación de sitios específicos en islas CpG¹¹². La hipometilación está asociada con regiones repetitivas del ADN y con elementos de transposición; aunque también se produce dentro de promotores de genes que normalmente están silenciados. A su vez, estas alteraciones conducen a una

inestabilidad genómica. La hipermetilación de genes específicos se produce con frecuencia en las regiones promotoras de genes supresores de tumores lo que lleva a su silenciamiento^{39,40}.

La metilación aberrante que normalmente se encuentra en el cáncer, tiene una importante implicación en la alteración de los mecanismos de regulación del epigenoma en las células¹¹³ (fig. 17). El uso de inhibidores de la metilación puede provocar el restablecimiento de la expresión de genes que estarían silenciados por hipermetilación de sus promotores.

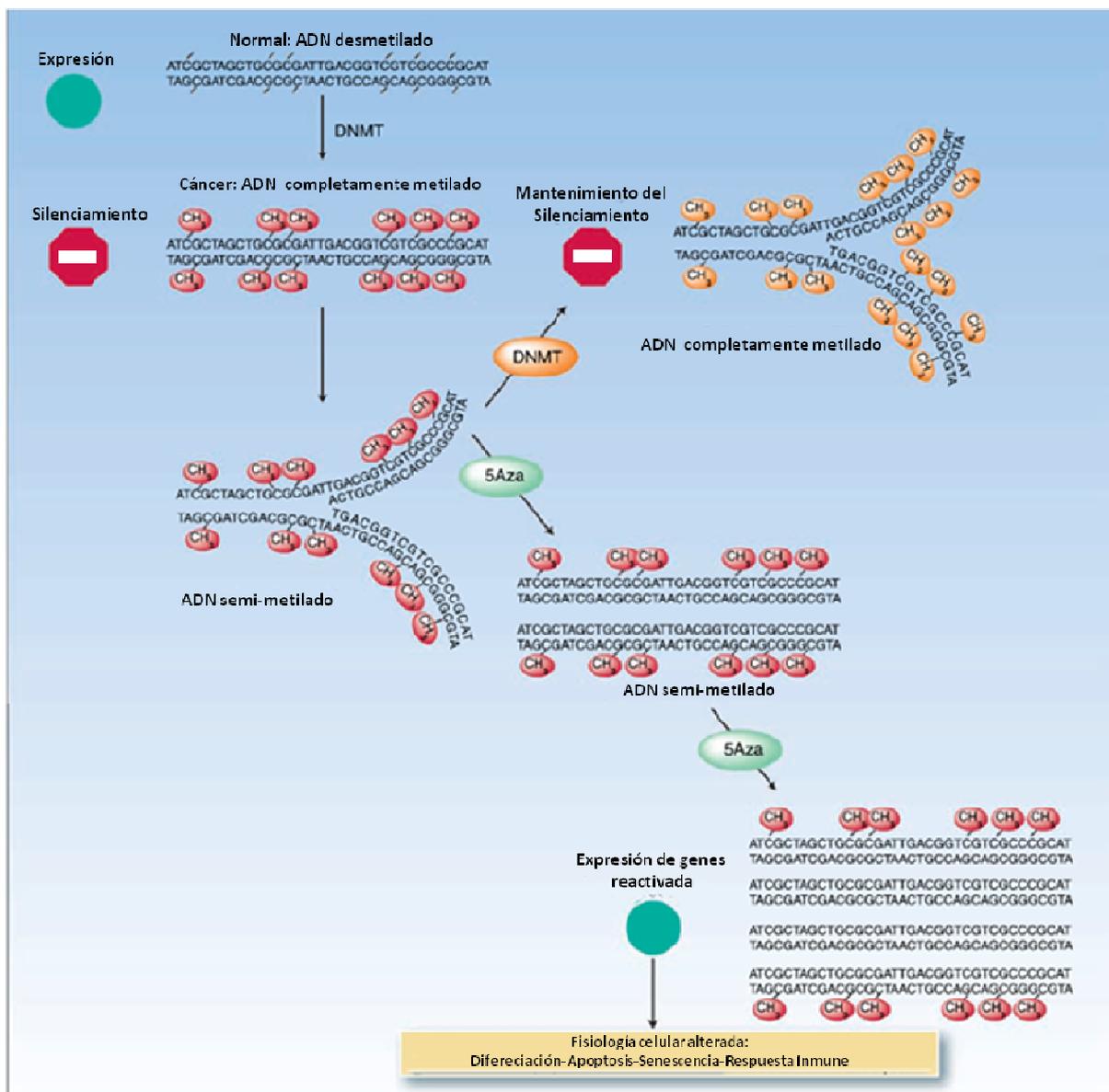


Fig. 17: Resumen de procesos de metilación en cáncer y efecto de fármacos inhibidores de la metilación. Se produce un rescate de la expresión génica que lleva a la reactivación de genes que se encontraban metilados y por tanto silenciados. Modificado de J.P.Issa 2007.

Además del cáncer, recientes estudios con células madre de la médula ósea han centrado su atención en las DNMTs y en la metilación, ya que forman una parte importante de los mecanismos de regulación de su desarrollo^{114,115,116}.

Se estima que hay cientos de genes silenciados en cada tipo de cáncer y muchos de estos genes juegan un papel importante en la aparición y perpetuación del fenotipo neoplásico¹¹⁶. La gran cantidad de genes que presentan cambios en su metilación, hacen que no sea sencillo limitar el mecanismo de acción de los fármacos reguladores de la metilación a dianas concretas. Sin embargo, existen casos en los que la inducción de hipometilación es capaz de reactivar la expresión de un receptor y, por tanto, recuperar los efectos de su ligando¹¹⁷. La desventaja es que esta hipermetilación afectaría también a otras vías que deban estar metiladas y, por tanto, silenciadas (por ejemplo, el control del ciclo celular, la apoptosis o la angiogénesis) o, hasta incluso, oncogenes que están silenciados por la metilación del ADN a pesar de haber fenotipo tumoral¹¹⁸.

En términos generales, los inhibidores de la metilación de ADN se dividen en tres clases: inhibidores nucleosídicos, inhibidores débiles no nucleosídicos e inhibidores diseñados.

Tipos de inhibidores de la metilación

Existen varios análogos de nucleósidos de pirimidina aprobados y comercializados, y otros actualmente en desarrollo tales como 5-aza-citidina (5-aza-C), 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-DC o Decitabina®), 5-fluoro-2'-desoxicitidina (5-F-dC), pseudoisocitidina y 2-H pirimidinona-1-β-D-(2'-deoxyriboside) (Zebularina®) (fig. 18). Todos estudiados como fármacos antitumorales⁶⁷.

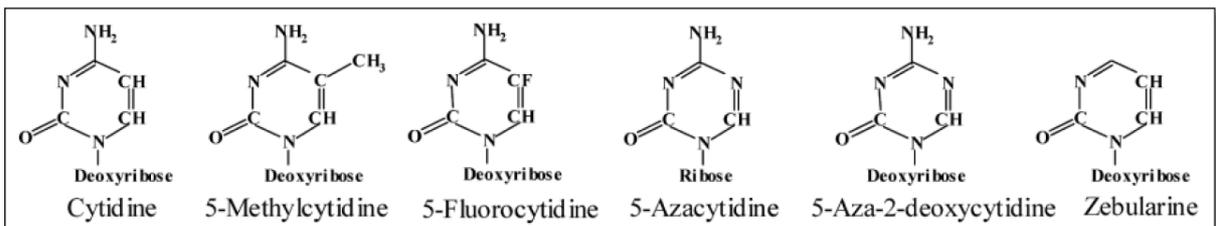


Fig. 18: Estructura química de los inhibidores de metilación análogos a nucleósidos.

Los primeros compuestos que se sintetizaron fueron 5-aza-C y 5-aza-dC, desarrollados durante los años 60 y 70 como compuestos citotóxicos¹¹⁹. Estos compuestos dan lugar a una fuerte reducción de la metilación del ADN debido a que el átomo de carbono aceptor del grupo metilo ha sido sustituido por nitrógeno, lo que impide la metilación. Los efectos biológicos de todos estos análogos dependen de su incorporación al ADN durante la síntesis y, por tanto, requieren células en división¹¹⁹. Ya se ha comentado que la desmetilación del ADN puede restaurar la expresión de genes que estaban silenciados por una metilación aberrante. Existen numerosos ejemplos de genes que permanecen silenciados en cáncer debido a una metilación aberrante y cuyo rescate terapéutico es más que deseable. Una hipometilación progresiva de la región promotora de estos genes podría reactivar en las células vivas procesos como la apoptosis que, en el caso de cáncer, están silenciados debido a mutaciones y aberraciones epigenéticas¹¹⁹.

5-azacitidina y 5-aza-2-desoxicitidina son dos análogos de la citosina que reclutan a todas las metiltransferasas de ADN y las dirigen a su degradación¹²⁰. Aunque dosis bajas de estos compuestos no inhiben la proliferación, estos fármacos son eficaces agentes hipometilantes y han demostrado una evidente actividad clínica como agentes antitumorales. Existen otros inhibidores como la *Zebularina* o el 5-fluoro-2-desoxicitidina que actualmente están aún en fases preclínicas^{67,121}.

Una limitación de los análogos de nucleósidos es que se requiere su incorporación en el ADN para ser efectivos y, por tanto, necesitan un estado activo de síntesis de ADN, lo que limita el uso y la actividad de estos fármacos en células que no están proliferando pero facilita que ese efecto no se produzca sobre células no tumorales.

El compuesto 5-aza-dC es un medicamento antineoplásico potente que se usa para tratar varios subtipos de síndrome mielodisplásico (MDS)¹²². Además, fármacos como 5-aza-C y 5-aza-dC han demostrado tener la capacidad de restablecer la sensibilidad a estos fármacos antitumorales en las células que mostraban una resistencia a la quimioterapia^{122,123}. Estas evidencias plantean la posibilidad de aplicar terapia combinada con medicamentos convencionales contra el cáncer en caso de resistencias utilizando inhibidores de metilación. El problema es que tanto el 5-aza-C y 5-aza-dC son químicamente

inestables debido a su estructura química, lo que hace de la aplicación oral algo imposible. Se han desarrollado varios análogos, pero en ningún caso se ha conseguido una respuesta similar. Es el caso de 5-fluoro-2'-desoxicitidina (5-FCdR). Este compuesto también inhibe la metilación del ADN y, por tanto, tiene un comportamiento similar, pero tiene el inconveniente de que genera productos potencialmente tóxicos como la 5-fluorodesoxiuridina y sus metabolitos¹²⁴.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la última década, se ha visto que la regulación de la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas desempeña un papel clave en el desarrollo de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer. Un descontrol de la actividad epigenética puede inducir el silenciamiento de genes que protegen contra el desarrollo tumoral o que inducen procesos de muerte celular controlada, y a la sobreexpresión de genes que favorecen la hiperproliferación descontrolada de las células.

Actualmente sabemos que en muchos tipos de tumores hay una desregulación importante del control epigenético de la expresión génica, abriendo nuevas vías de desarrollo de fármacos antitumorales.

En nuestro trabajo nos planteamos profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de los fármacos reguladores de cambios epigenéticos; para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- Caracterizar el efecto del inhibidor de histonas desacetilasas Panobinostat® a nivel proteómico sobre un grupo de líneas celulares derivadas de tumores de mama y colon.
- Analizar la influencia de los genes reparadores MLH1 y BRCA1 en la respuesta al tratamiento con Panobinostat®.
- Estudiar las variaciones de la expresión de miARNs de líneas celulares derivadas de tumores de mama, colon y mieloma tras el tratamiento con Panobinostat®
- Analizar la respuesta de las líneas celulares derivadas de tumores de mama y colon a fármaco epigenético inhibidor de la metilación como la Decitabina®.
- Determinar si existen efectos sinérgicos entre dos fármacos epigenéticos que actúan a nivel de la acetilación de histonas (Panobinostat®) y de la metilación del ADN (Decitabina®) en líneas celulares derivadas de tumores de mama y colon..

Metodología

METODOLOGÍA

REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO

Los medios de cultivo fueron adquiridos a LONZA (Basel, Suiza) y a GIBCO (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), el suero bovino fetal (FBS) y los antibióticos (penicilina/estreptomicina) a Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). El material de plástico utilizado para el cultivo celular fue comprado a Becton Dickinson Inc. (BD, San Diego, CA, USA). La electroforesis en gel de poliacrilamida tanto para western blot como para la electroforesis bidimensional se llevó a cabo en cubetas Mini-PROTEAN®3 y PROTEAN® Ili Cell (BioRad, Hércules, CA, USA). La transferencia a membranas de PVDF suministradas por Millipore Corporation (Billerica, MA, USA) se realizó usando el sistema de transferencia semiseco TRANS BLOT® SD de BioRad. Las películas de autorradiografía fueron de FUJIFILM (Düsseldorf, Alemania). Las medidas de absorbancia y la cuantificación de proteínas se realizaron en un espectrofotómetro modelo SmartSpec™Plus (BioRad, Hércules, CA, USA). En el caso de las placas multipocillo, la densidad óptica se determinó utilizando un lector automático ULTRA Evolution de Tecan (Oberkochen, Alemania). Los ensayos de incorporación de yoduro de propidio (IP), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se realizaron utilizando la aplicación CellQuest en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD, San Diego, CA, USA). El ciclo celular se analizó con el programa WINMDI 2.9. Para la extracción de ARN se utilizó el reactivo Trizol® de Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La ARNasa fue suministrada por Promega (Madison, WI, USA). La enzima ADN polimerasa y los nucleótidos fueron suministrados por la casa comercial 5Prime (Gaithersburg, MD, USA). Las hormonas Hidrocortisona e Insulina suministradas a los cultivos fueron adquiridas a Sigma-Aldrich. Los cebadores utilizados en las distintas reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron sintetizados por Invitrogen y diseñados con el programa Primer3. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) fue suministrado por Sigma-Aldrich. El fármaco LBH589 (Panobinostat®) (Novartis Pharmaceuticals, Basel, Suiza) fue proporcionado por el servicio de hematología del Hospital Universitario de Salamanca y fue utilizado a las concentraciones de 50nM, 75nM, 100nM y 150nM. El compuesto 5-aza-2'-desoxicitidina (Decitabina®) fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y utilizado a las concentraciones de 0,5µM, 1 µM, 2 µM y 3µM. El experimento de sinergia se realizó

combinando las 4 concentraciones de los compuestos 50nM + 0,5µM, 75nM + 1µM, 100nM + 2µM y 150nM + 3 µM.

El resto de reactivos generales utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Roche Applied Science (Mannheim, Alemania), Merck (Darmstadt, Alemania), Promega (Madison, WI, USA) y BioRad (Hércules, CA, USA).

ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios comerciales utilizados en el presente trabajo se detallan a continuación (tabla 2) indicándose también la casa comercial a la que se adquirieron.

Tabla 2: Anticuerpos primarios comerciales utilizados.

ANTICUERPO	ESPECIE	CASA COMERCIAL
Anti-Acetil histona 3 (Lys14)	Conejo (policlonal)	Abcam
Anti-Acetil histona 3 (Lys18)	Conejo (policlonal)	Abcam
Anti-Acetil histona 3 (Lys9)	Conejo (policlonal)	Abcam
Anti-Actina	Ratón (monoclonal)	Abcam
Anti-AURKA	Ratón (monoclonal)	Abcam
Anti-AURKB	Conejo (policlonal)	Abcam
Anti-AURKB	Ratón (monoclonal)	BD Transduction Laboratories
Anti-Caspasa 8	Ratón (monoclonal)	BD Transduction Laboratories
Anti-HDAC1	Conejo (policlonal)	Abcam
Anti-HDAC2	Conejo (policlonal)	Abcam
Anti-HDAC3	Conejo (policlonal)	Abcam

Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan a continuación (tabla 3).

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados. H: cadena pesada de la inmunoglobulina. L: cadena ligera de la inmunoglobulina.

ESPECIE RECONOCIDA	MOLÉCULA CONJUGADA	ANTÍGENO	CASA COMERCIAL
Conejo	HRP	IgG (H+L)	BioRad
Conejo	HRP	IgG (L)	Millipore
Ratón	HRP	IgG (H+L)	BioRad
Ratón	HRP	IgG (H+L)	GE Healthcare

CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas en nuestros estudios se detallan a continuación (tabla 4):

Tabla 4: Líneas celulares utilizadas y resumen de mutaciones. TN: triple negativo. Subtipo Basal A: referido a queratina 5 y queratina 14 positivo; Subtipo Basal B: referido a Vimentina positivo.

	LÍNEA CELULAR	HISTOLOGÍA	SUBTIPO	GENES MUTADOS
Cáncer de Mama	hs578T	Carcinoma sarcoma	TN (Basal B)	CDKN2A, HRAS, PIK3CA, TP53
	MDA-MB-231	Adenocarcinoma metastático	TN (Basal B)	BRAF, CDKN2A, KRAS, NF2, TP53
	BT549	Carcinoma ductal invasivo	TN (Basal B)	PTEN, RB1, TP53
	Sum149Pt	Carcinoma inflamatorio	TN (Basal B)	BRCA1, CDKN2A, TP53
	HCC1937	Tumor primario	TN (Basal A)	BRCA1, RB1, PTEN, MAPK13, MCD1, TP53
	MCF7	Adenocarcinoma metastático	Luminal	CDKN2A, CDKN2a(p14), PIK3CA
Cáncer de colon	HCT116	Carcinoma colorectal		CDKN2A, CDKN2a(p14), CTNNB1, KRAS, MLH1, PIK3CA
	HT29	Carcinoma colorectal		APC, BRAF, PIK3CA, SMAD4, TP53
Mieloma Múltiple	MM1S	Mieloma de IgA lambda		COL10A1, LAMA5, KRAS, LAMB2, TYK2
	H929	Plasmacitoma		NRAS

Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera en presencia de un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Las células de mieloma múltiple fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con L-glutamina que se suplementó con penicilina y estreptomina (100U/ml y 100µg/ml, respectivamente) y con un 10% de suero fetal bovino. Las líneas de cáncer de colon y cáncer de mama, a excepción de la línea *Sum149pt*, fueron cultivadas en medio DMEM con glucosa (4,5g/l), L-glutamina y L-piruvato y suplementado con antibióticos y un 10% de FBS. La línea *Sum149pt* fue cultivada en medio Ham's F12 suplementado con 5% de FBS, Insulina e hidrocortisona (5µg/ml y 1µg/ml, respectivamente). Todas las líneas fueron tratadas con los compuestos Panobinostat® y Decitabina® durante 72 horas muestreando cada 24 horas y utilizando como control un T0 sin tratar.

EXTRACCIÓN DE ADN DE LÍNEAS CELULARES

El ADN de alto peso molecular se extrajo manualmente a partir de lisados de cada una de las líneas celulares.

Tras despegar las líneas celulares de las placas y centrifugarlas para eliminar los restos del agente de disociación TriPlex (Gibco), se resuspendieron en tampón Fornace (0.25M sacarosa; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl₂); EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 0.5 pH 8; proteinasa K 20 mg/L y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%. El EDTA es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas, la proteinasa K degrada las proteínas, y el SDS es un detergente capaz de romper las membranas celulares.

Esta mezcla se incubó a 55°C durante unas 16 horas, tras lo cual se purificó el ADN tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y centrifugando 10 min a 2000 r.p.m. El ADN contenido en la fase acuosa se limpió de residuos proteicos y detritus celulares mezclándolo con CIAA y centrifugando de nuevo 10 min a 2000 r.p.m. Se rescató la fase acuosa y con la adición de etanol absoluto, se precipitó el ADN. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% y una centrifugación a 12000 r.p.m. Finalmente, el ADN se resuspendió en ddH₂O. Las muestra de ADN se almacenaron en tubos Eppendorf® a -20° C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como la posible contaminación. La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN así obtenido se calcula tras medir la absorbancia a 260 y 280nm siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = D.O. \text{ a } 260\text{nm} \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

El valor 50 es un factor de corrección introducido, ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260nm es el valor de absorbancia que tienen 50g/mol de ADN.

El cociente D.O.260/D.O.280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica. Se consideran valores aceptables los comprendidos entre 1.6 y 2.0; siendo el óptimo 1.8. Los valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos. Los valores superiores indican un exceso de ARN en la muestra.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

El ARN se extrajo de las células mediante el método de extracción fenólica de Chomczynski y Sacchi¹²⁵ modificado en el protocolo del TRIZOL® Reagen (Invitrogen). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que tras añadir cloroformo se separa la muestra en dos fases, una fase acuosa y otra orgánica. El ARN permanece en la fase acuosa y es precipitado con isopropanol. Tras precipitar, el ARN se lava con etanol al 75%, se centrifuga, se retira el alcohol y se deja secar el precipitado que se resuspende finalmente en agua tratada libre de ARNasas. En nuestro caso los precipitados se resuspendieron y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Para determinar la concentración y la calidad del ARN obtenido, se preparó una dilución 1:10 con agua libre de ARNasas y se midió por duplicado la absorbancia a 260 y 280nm en un espectrofotómetro.

PCR Y GENOTIPADO

Los exones y las secuencias intrónicas flanqueantes de los genes analizados de las muestras de ADN celular fueron amplificadas por medio de la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 µl con los siguientes reactivos:

- 10µl de MasterMix 5´Prime Eppendorf® (contiene Taq Polimerasa, KCl, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg²⁺ y el detergente Igepal®-CA360).
- 10µl de agua libre de nucleasas.
- 1µl de cada oligonucleótido cebador.
- 1µl de adicional de Mg²⁺ a 25nM.
- Como ADN molde se añadieron 100ng cada una de las muestras.

Como control negativo se utilizó un tubo de reacción con todos los componentes excepto el ADN molde. Para la amplificación por PCR de los exones que conforman los genes

analizados se utilizaron varios programas derivados del estándar y adaptados a las exigencias de cada exón (fig. 19).

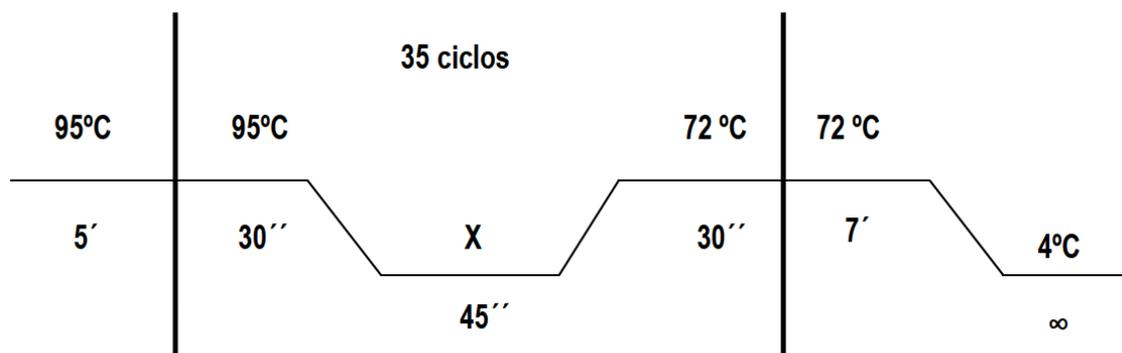


Fig. 19: Programa genérico de amplificación por PCR. La X refleja la temperatura de anillamiento propia de cada fragmento amplificado.

A continuación se detallan las temperaturas de anillamiento para cada exón amplificado (tabla 5):

Tabla 5: Relación de primers utilizados para la amplificación de los fragmentos de interés y sus respectivas temperaturas de anillamiento.

PRIMERS	SECUENCIA	ANILLAMIENTO
p53 ex 5 sentido p53 ex 5 antisentido	ACTTTCAACTCTGTCTCCTTCCTCTTC CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG	56°C
p53 ex 6 sentido p53 ex 6 antisentido	CCAGAGACCCCAGTTGCAA CCAGAGACCCCAGTTGCAA	55°C
p53 ex 7 sentido p53 ex 7 antisentido	TCATCTTGGGCCTGTGTTATCTC GTGCAGGGTGGCAAGTGG	58°C
p53 ex 8 sentido p53 ex 8 antisentido	CCTCTTGCTTCTCTTTTCCTATTCT CGCTTCTGTCTGCTTGCT	53°C
PTEN ex 8 sentido PTEN ex 8 antisentido	CATTAATTAAATATGT TTAAACATTTTGTTGG	55°C
BRCA1 ex 11 sentido BRCA1 ex 11 antisentido	CTGAAGTTAACAATGCACCTGG CCACTCTGGGTCCTTAAAGAA	56°C
BRCA1 ex 21 sentido BRCA1 ex 21 antisentido	AAGCTCTCCTTTTTGAAAGTC AGAGGCTATTCTATTTCTCTAC	54°C
MLH1 ex 9 sentido MLH1 ex 9 antisentido	TCTGATTCTTTTGTAATGTTTGAGTTTTG CATAAAATCCCTGTGGGTGTTTC	55°C
RB1 cDNA sentido RB1 cDNA antisentido	GTAACGGGAGTCGGGAGAGGACG CGGCCGCGTGGCCATAAACAGAA	56°C

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

El tamaño del producto amplificado y su intensidad se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa preparados al 2% con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0mM pH=8,3) y teñidos con bromuro de etidio. Las muestras migraron en paralelo a un marcador de tamaño de ADN derivado del ADN del fago ΦX-174 cortado por la endonucleasa Hae III. Los fragmentos que esta endonucleasa genera en el DNA del fago ΦX-174 se corresponden con los siguientes tamaños: 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 Kb. La electroforesis se llevó a cabo con un potencial constante de 120 voltios durante 40 minutos.

Para la monitorización de la electroforesis, el ADN se mezcló con dos colorantes incorporados al tampón de carga: el xileno cianol, que migra con los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0.5 Kb.

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Todos los productos de PCR fueron secuenciados para identificar las mutaciones. Para ello se purificaron con el fin de eliminar cualquier resto de cebadores, dNTPs o iones procedentes de la reacción, que puedan inhibir la reacción de secuenciación. Para la purificación se utilizó el kit comercial “High Pure Product Purification Kit”, Roche.

La secuenciación de los productos purificados se llevó a cabo en el secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca y en el secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca). Se preparó una muestra con el cebador con sentido y otra con el cebador antisentido a una concentración de 3pmol en un volumen de 2 µL. El DNA se preparó a una concentración de 40–60ng para un volumen final de 8µL.

ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI)

Se analizó la inestabilidad de microsatélites de todas las líneas celulares utilizadas. Se usaron los cinco marcadores de microsatélites recomendados en el panel de Bethesda (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 y D17S250) (tabla 6).

Tabla 6: Marcadores para el estudio de MSI donde se incluye la localización en el cromosoma y en el gen correspondiente, número de repeticiones que presenta, el fluorocromo, los oligonucleótidos sentido (señalado con un asterisco) y antisentido y el tamaño aproximado del producto de PCR.

MARCADOR	LOCUS	SECUENCIA	Nº DE REPETICIONES	FLUOROCROMO	OLIGONUCLEÓTIDOS SENTIDO Y ANTISENTIDO	TAMAÑO (pb)
BAT25	4q12	Intrón del oncogén c-Kit	1 bp	TET	*TCGCCTCCAAGAATGTAAGT TCTGCATTTTAACTATGGCTC	110-130
BAT26	2p22-21	Intrón 5 del gen hMSH2	1 bp	HEX	*TGACTACTTTTGACTTCAGCCACC ATTCAACATTTTAAACCC	100-120
D5S346	5q21-22	Locus del gen APC	2 bp	FAM	*ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG AGCAGATAAGACAGTATTACTAGT	100-130
D2S123	2p16	Locus del gen hMSH2	2 bp	FAM	*AAACAGGATGCCTGCCTTTA GGACTTTCCACCTATGGGAC	200-230
D17S250	17q11.2	Locus cromosoma 17	2 bp	FAM	*GGAAGAATCAAATAGACAAT GCTGGCCATATATATTTAAACC	140-170

Las reacciones de amplificación se realizaron con 0,08µl de Gold Taq ADN polimerasa® (Applied Biosystems) 5U/µl, 1,0µl de tampón adecuado (10x PCR Buffer II), 0,8 µl de solución de MgCl₂ 2,5mM, 1,0 µl de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato) 25 µM, 0,3 µl de cada oligonucleótido 0,3µM y 1,0 µl de ADN obtenido por los métodos anteriormente descritos (concentración entre 0,1 y 0,2 µg/mL). El volumen final de reacción fue en todos los casos de 10 µl que se ajusto con ddH₂O libre de nucleasas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de Applied Biosystems, cuyas condiciones generales de amplificación se muestran en la fig. 20.

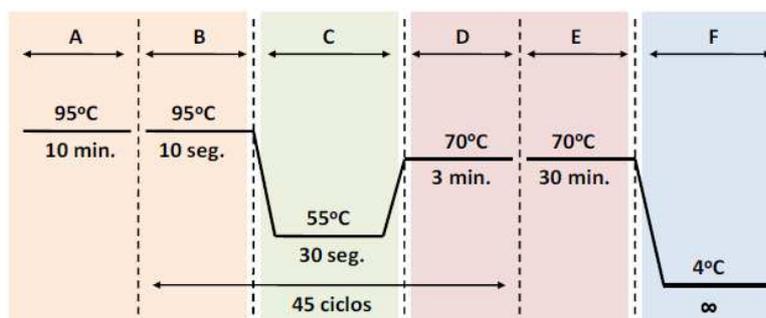


Fig. 20: Esquema representativo del programa del termociclador para la amplificación de fragmentos de ADN. Donde A es el tiempo de desnaturalización previa, B-C-D son los tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y elongación, y E es el tiempo de extensión final seguido de una bajada de temperatura para su conservación (F). Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo y el número de ciclos de B-C-D.

El análisis de los fragmentos amplificados se llevó a cabo resuspendiendo en 1 µl de producto amplificado 12 µl de formamida desionizada y 0,2 µl de marcador de tamaños ROX

(GenScan™500). Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI Prism 3700 (PE Applied Biosystems) y los resultados se visualizaron mediante el software Peak Scanner v1.0 comparando los electroferogramas procedentes de las muestras de todas líneas celulares para ver diferencias de tamaño de secuencia o de pico.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Las células fueron recogidas de las placas de cultivo utilizando el reactivo TryPle 1X (Gibco), en el caso de aquellas que crecen adheridas a la placa, y se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante tres minutos. Tras lavar el precipitado celular con PBS se incubaron durante una hora con buffer de lisis en frío y en agitación (NaCl 140mM, EDTA 10mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris 20mM pH 8.0) al que se le añadieron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1mM, pepstatina 1 μ M, aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml y orto vanadato sódico 1mM. Se recogieron los extractos celulares, se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 12000 r.p.m. y se transfirieron los sobrenadantes resultantes, que contenían la mezcla de proteínas, a un nuevo tubo Eppendorf®. Todo el proceso se realizó en frío.

Los extractos proteicos obtenidos se cuantificaron mediante el método de la Seroalbúmina bovina (BSA)¹²⁶ y se utilizaron para electroforesis mezclando la cantidad de proteína necesaria con tampón de carga (4% SDS, 0,05% azul de bromofenol, 20% glicerina, 2% β -mercaptoetanol, Tris 100mM pH 6.8) e hirviendo la mezcla durante 10 minutos. Seguidamente se pasaron a frío hasta su carga en el gel.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT

La separación de proteínas se realizó por electroforesis en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli¹²⁷. Las muestras se cargaron en geles de distinto porcentaje de poliacrilamida en función del peso molecular de la proteína de interés.

La electroforesis se llevó a voltaje constante en tampón de electroforesis (Tris 20mM, Glicina 192 mM y 1% SDS). Tras finalizar la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de PVDF mediante un sistema de transferencia semiseco a 15V constantes en ambiente húmedo de tampón (Tris 20 mM, pH 8.3; Glicina 192 mM). El tiempo de transferencia se fijó en función del porcentaje y grosor del gel de poliacrilamida. A continuación se bloquearon los sitios de unión inespecífica dejando al menos 1 horas la membrana en solución de bloqueo: Solución de TBS-T (NaCl 140 mM, Tween20 0,05%, Tris 10mM pH 7.5) con 1% de BSA o 5% de leche desnatada en polvo. Se incubaron las membranas con el anticuerpo correspondiente disuelto en solución TBS-T con 1% o 5% de BSA. El tiempo de incubación del anticuerpo primario fue desde al menos dos horas a temperatura ambiente hasta toda la noche a 4°C, transcurrido el cual, las membranas fueron lavadas tres veces, durante 7 minutos cada vez, con TBS-T y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) disuelto en TBS-T o en leche desnatada. Tras realizar tres lavados, las bandas se visualizaron por radiografía con un sistema de detección basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno¹²⁷⁻¹²⁹. Para ellos se incubaron durante dos minutos en solución de revelado (luminol 0,08%; 4-yodofenol 0,02%; Tris 0,1 M pH 9.3) al que se le añadió H₂O₂ (0,44 mM) en el momento.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE)

Las proteínas se precipitaron con el kit de "purificación" (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. De cada una de las muestras se cogió un miligramo de proteína para el ensayo 2-DE. El precipitado de proteína se disolvió en tampón de rehidratación (7 M de urea, 2M tiourea, 4% de CHAPS (w/v), 0.5 % anfolitos, DTT 50 mM y azul de bromofenol) antes de la carga en una tira con un gradiente de pH inmovilizado (IPG), gradiente de pH lineal de 3-11, 4-7, 3-5,6 y 6-11, 18 cm de largo, (GE Healthcare). El gradiente isoeléctrico se realizó utilizando el dispositivo IPGphor (GE Healthcare). Las tiras se rehidratan activamente a 30-60 V durante 12h. Posteriormente, la separación comienza a 500V aumentando la tensión gradualmente hasta 8000V y manteniéndola constante durante 6 horas. Inmediatamente después de esto, las tiras de IPG se equilibraron durante 15 min en

DTT 1 % (w/v) en tampón de equilibrado (50 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 6 M de urea, 30% de glicerol (v/v), SDS al 2% (w/v), 0,01% de azul de bromofenol (w/v)), seguido por otros 15 min en 2,5% yodoacetamida (w/v) en el mismo tampón. La separación de segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 12-15%. Los geles (160x180x1mm) se procesaron a 40 mA utilizando la cubeta Ruby 600 SE (GE Healthcare). Después del proceso de 2-DE, las proteínas en el gel se fijaron con una solución al 50% de metanol, y 7% de ácido acético durante 30 min y se tiñeron durante la noche con el kit Sypro Ruby (Molecular Probes), siguiendo las instrucciones del fabricante (fig.21). Los geles teñidos fueron escaneados con un sistema DIGE Imager Ettan (GE Healthcare). Al menos se realizaron 3 replicas de cada uno de los geles y se uso como control las mismas células sin tratar. Determinamos qué puntos tenían una diferencia de expresión estadísticamente significativa comparando el control con 72 horas de incubación con Panobinostat® a una concentración de 50nM. Consideramos significativo un *p-value* < 0,05. De aquellos puntos donde observamos la existencia de diferencias, realizamos una identificación mediante espectrometría de masas para identificar cada una de las proteínas (fig. 22).

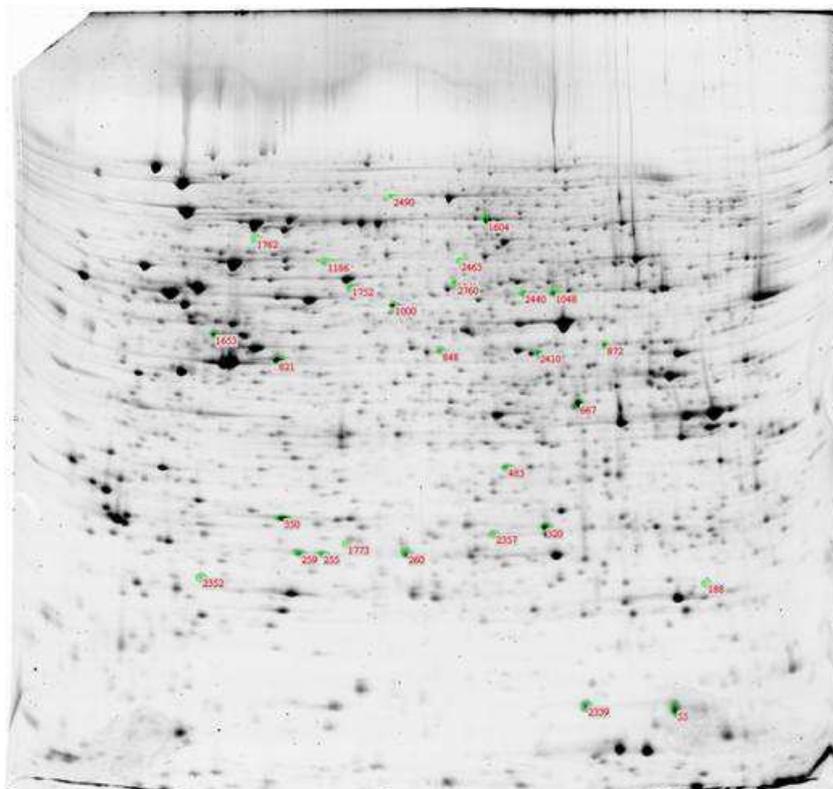


Fig. 21: Gel de acrilamida con el mapa proteico para una muestra de células. En primer lugar se realizó una separación de proteínas según su punto isoeléctrico en un gradiente de pH bajo corriente. Tras esta primera separación, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida separando las proteínas en función de su tamaño.

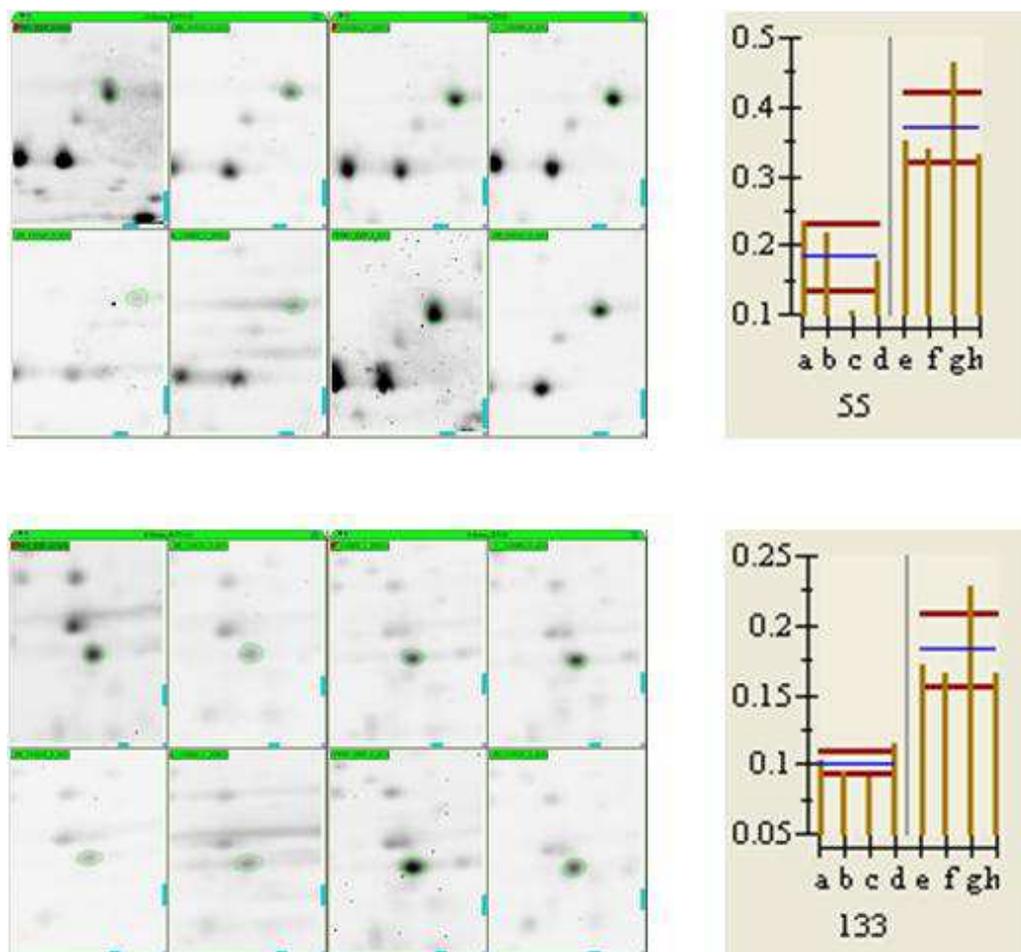


Fig. 22: Porción de geles de acrilamida que presentan diferencias significativas en la comparación. Una vez que se realizaron los mapas proteicos de cada muestra y se hicieron replicas, se realizó el análisis comparativo mediante el software DIGE Imager Ettan (GE Healthcare). Aquellos puntos que presenten diferencias significativas entre las dos comparaciones, se emplearon en análisis posteriores.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las proteínas de interés fueron extraídas del gel de poliacrilamida manualmente y se lavaron durante 5 minutos en agua destilada. Se retiró el agua y los pedazos de gel se incubaron durante 20 minutos con 25 mM de NH_4HCO_3 y luego con una mezcla de 25 mM de NH_4HCO_3 y acetonitrilo al 50% durante otros 20 min. Este último lavado se repitió una vez más. El sobrenadante se retiró y los pedazos de gel se incubaron con una mezcla de 25 mM de NH_4HCO_3 y 50% de etanol durante 20 min. Tras esto, las láminas de gel se deshidrataron en etanol durante 15 min. Después, se eliminó el etanol, y los trozos de gel se secaron durante 15 min en una centrifuga de vacío. Una vez secos, se incubaron a continuación en una mezcla de 50 mM de NH_4HCO_3 y 10 mM de ditiotretitol (DTT) durante 1 hora a 56°C . El

DTT se retiró y los pedazos de gel se incubaron con 50 mM de NH_4HCO_3 junto con 55 mM de yodoacetamida durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. El sobrenadante se retiró y los tozos de gel se lavaron en 50 mM de NH_4HCO_3 dos veces durante 15 minutos en una mezcla de 25 mM de NH_4HCO_3 y acetonitrilo al 50% durante 30 min. Esta solución se retiró y las rodajas de gel se deshidrataron en acetonitrilo y se dejaron secar.

Los trozos de gel fueron rehidratados en 25 mM de NH_4HCO_3 y se incubaron con tripsina porcina modificada (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) durante toda la noche a 37°C. Los péptidos se extrajeron de los cortes de gel en acetonitrilo durante 15 min a 37°C y, posteriormente, en 0,2 % de ácido trifluoroacético (TFA) (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. La solución se evaporó en una centrífuga de vacío y se disolvieron los péptidos en 0,1% de TFA-acetonitrilo (2:1) con sonicación cuando los péptidos se analizaron mediante MALDI-TOF, y en 50% de metanol (v/v)/1% ácido fórmico (v/v) con sonicación cuando los péptidos se analizaron con LC-ESI-MS/MS.

SISTEMA DE IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY Y HPLC-MASAS (LC-ESI-MS/MS)

El análisis LC ESI-MS/MS se llevó a cabo en un dispositivo *Ultimate nanoHPLC 3000* (Dionex, Sunnyvale, California) acoplado a un espectrómetro de masas *HCT Ultra ion-trap* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Se utilizó una columna analítica basada en sílice de fase inversa C18 *PepMap 75* micras x 15 cm, 3 micras de tamaño de partícula y tamaño de poro 100 Å (Dionex, Sunnyvale, California). La columna trampa fue una *PepMap C18* (Dionex, Sunnyvale, California) de 5 micras de diámetro de partícula, tamaño de poro 100 Å y conectada en línea con la columna de análisis tras un tiempo de carga 5 min. La bomba de carga inyecta una solución de ácido trifluoroacético al 0,1% en 98% de agua con acetonitrilo al 2% a un flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. La microbomba proporcionó una velocidad de flujo de 300 nl/min y se hizo funcionar en condiciones de elución en gradiente, utilizando ácido fórmico al 0,1% como fase móvil A, y 0,1% de ácido fórmico en 80% acetonitrilo y 20% de agua como fase móvil B. La elución en gradiente fue realizada de acuerdo con el siguiente esquema: condiciones isocráticas de 4% de solución B durante 5 min, un aumento lineal a 40% de B

durante 60 min, un aumento lineal a 95% de B durante 1 min y condiciones isocráticas del 95% de B durante 7 min. El volumen de inyección fue 5 l y la absorbancia se monitorizó a 214 y 280 nm.

El sistema LC se acopla a través de una fuente de nanopulverización al espectrómetro de masas de trampa de iones posicionado en modo de ion positivo, con el conjunto de tensión capilar a 1400V. Los datos brutos del LC-MS fueron procesados usando el software DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Las muestras se fraccionaron primero mediante una electroforesis monodimensional SDS-PAGE y los datos obtenidos a partir de la LC correspondientes a diferentes porciones de gel se fusionaron utilizando una herramienta combinatoria de análisis antes de procesarlos como un solo experimento.

Para las muestras de 2D-CF, el análisis MS se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas Applied Biosystems QSTAR XL, con un Agilent 1100 micro HPLC. Se utilizó una columna Discovery BIO de poro ancho 150x0.32 mm (5 micras) (Supelco, Bellefonte, USA), con un caudal de 7 μ l/min. Como eluyente se utilizó un gradiente de agua con ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo. Las condiciones iniciales fueron acetonitrilo al 2% con un gradiente hasta 30% en 15 min y luego hasta el 100% en 24 min. Los espectros MS/MS se obtuvieron para identificar los péptidos y se sometieron a una búsqueda *Mascot*.

MALDI-TOF/TOF

Análisis MALDI-TOF de péptidos trípticos se realizó en un instrumento Autoflex III TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) funcionando en modo reflector con un voltaje de aceleración de 21000 V. Se extendió un microlitro de la muestra sobre los soportes pre-marcados (AnchorChip Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) con una matriz de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) para 96 muestras y preparados con 24 calibradores. Después de tres minutos de incubación, toda la gota se eliminó con 10 μ l de tampón de lavado que contiene 10mM de fosfato de amonio monobásico en 0,1 % de TFA. El equipo se calibró primero externamente empleando señales de masas protonadas de los calibradores pre-marcados de los blancos, que cubren un rango de 1.000-4.000m/z. Los espectros se

leyeron con el software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y después se procesaron utilizando el software Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La lista de los picos se generó utilizando las señales en la región de 800-4,000 m/z , con un umbral de ruido de fondo mayor que 4. El algoritmo de SNAP incluido en el software se utiliza para seleccionar los picos monoisotópicos de las distribuciones isotópicas observadas. Se eliminaron los picos correspondientes a los iones observados con frecuencia procedentes de la matriz, queratinas y péptidos tripsina de autólisis. La lista de picos resultante se utilizó para la identificación de proteínas mediante *fingerprinting*.

ANÁLISIS DE DATOS DE MS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La identificación de proteínas se realizó utilizando el programa *Mascot* (<http://www.matrixscience.com>) contrastando con dos bases de datos de secuencias de proteínas no redundantes: Swiss Prot (que contiene 516.603 secuencias y 181.919.312 residuos) y NCBI nr (que contiene 10.927.723 secuencias y 3.720.794.783 residuos)¹³⁰. La tolerancia de masas se fijó en 50 ppm; la de MS/MS fue de 0,5Da para LC-ESI-Q-TOF y de 50 ppm para MALDI-TOF-TOF, y las categorías taxonómicas eran Rattus (Swiss Prot : 7.509 secuencias; NCBI nr : 66.746 secuencias) o, alternativamente, Rodentia (Swiss Prot : 25.498 secuencias ; NCBI nr : 231.945 secuencias) cuando no se obtuvo resultado en la taxonomía Rattus. Sólo se permitió la pérdida de una escisión por péptido y se asumieron tanto residuos de cisteína que se carbamidometilaban con aductos de acrilamida como residuos de metionina en forma oxidada. El punto de significación se estableció en <0,05.

EXTRACCIÓN DE miARN Y MICROARRAY

El ARN fue aislado de cada una de las líneas celulares utilizando el kit *miRNeasy Mini* (Qiagen, US) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad y calidad de miARN y de ARN fueron monitorizadas utilizando el kit *ARN Nano Chips* mediante *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El marcaje de miARN fue realizado utilizando el kit de *Exiqon miRCURY LNA miARN Array kit* (Exiqon, Denmark). Se utilizó un chip *Exiqon miRCURY LNA™ microARN Array* proporcionado con el kit

para cada una de las muestra. Las muestras fueron hibridadas utilizando el protocolo de Tecan® mediante *hs4800 Pro hybridization Station*. Tras la hibridación, se escanearon los cristales utilizando el escaner Genepix 4000b (Molecular Devices, US).

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para cada línea celular (*HT29*, *HCC1937*, *HCT116*, *H929* y *MM1S*) los arrays fueron hibridados a 24 horas y a 72 horas por cuadruplicado, de modo que fueron analizadas un total de 40 muestras. Los valores de *log-ratio* para cada miARNs fueron extraídos comparando la expresión de cada muestra con el control a tiempo 0. Los valores perdidos fueron imputados mediante el método clásico de las medias de cada variable utilizando SPSS (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp). Los datos fueron normalizados por el método de cuantiles implementado en el paquete "affy" en R (www.r-project.org). Las comparaciones entre los diferentes grupos a estudio se llevaron a cabo mediante SAM (www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/) para determinar aquellos miARNs cuya expresión presentaba diferencias estadísticamente significativas (SAM $Q < 5\%$) entre los grupos comparados. El software EXPANDER fue utilizado para el análisis de clustering y expresión heat map de los miARN que presentaron cambios significativos en la expresión.

IDENTIFICACIÓN DE DIANAS DE MIARN

Para la identificación de las dianas y el contexto biológico de los miARNs que resultaron presentar cambios estadísticamente significativos, utilizamos el programa IPA (Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>). La significación y la validación de estas dianas fueron realizadas utilizando TargetScan (<http://www.targetscan.org>) donde podemos comprobar las interacciones entre los miARNs desregulados y los ARNm.

ANÁLISIS REACTIVIDAD DE COMPUESTOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Para descartar cualquier tipo de reactividad de los dos compuestos utilizamos recurrimos al laboratorio de química orgánica de la Universidad de Salamanca, para realizar una espectrometría de masas de uno de los compuestos a la concentración máxima utilizada y de la mezcla de ambos en condiciones similares a las de un cultivo celular, para descartar o confirmar cualquier tipo de reacción entre los compuestos. En primer lugar, realizamos la espectrometría de masas con la Dicitabina® y determinamos su tamaño en función de la relación masa/carga de la molécula. Esta relación es única para cada molécula y grupo funcional, lo que permite hacer una discriminación de moléculas de diferente masa y carga electrónica. Posteriormente, mezclamos los dos compuestos y realizamos la espectrometría de masas bajo las mismas condiciones de humedad, temperatura y concentración de CO₂ que tenemos en el incubador.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Evaluamos el crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento con los compuestos por separado y en combinación mediante el ensayo MTT¹³¹. Este consiste en el marcaje de células metabólicamente activas con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Este compuesto tiene un color amarillento, al ser reducido por la enzima Succinato deshidrogenasa (SDH) en la célula, da lugar a un compuesto hidrofóbico de color azul oscuro, el formazán. Este compuesto se solubiliza con DMSO. Posteriormente se mide la intensidad de color con un espectrofotómetro lo que nos permite determinar la tasa de proliferación. A mayor color, mayor absorbancia y, por tanto, mayor cantidad de células en cultivo metabólicamente activas. Se sembraron un total de 10.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se las dejó crecer toda la noche. Tras esto, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos y un volumen igual de DMSO como control y, a continuación se incubaron durante 24, 48, o 72 horas. Como control se utilizó una placa previa (tiempo 0) sin ningún tipo de fármaco. Después de eliminar el medio, se añadió 1 mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio y se incubó a 37 °C. Tras 1h, se eliminó el sobrenadante y se añadió DMSO para disolver los cristales

depositados. Las absorbancias se determinaron a 560 nm utilizando un lector de microplacas UltraEvolution (Tecan®).

ANÁLISIS DEL CICLO Y LA MUERTE CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

El estudio del ciclo celular en las distintas líneas en cultivo se realizó cuantificando el contenido de ADN de estas por citometría de flujo. Para ello, las células fueron tratadas con las distintas concentraciones de los compuestos suministrados junto al medio completo requerido por cada línea celular durante 24, 48 y 72h respectivamente, tomando un tiempo 0 como control. Tras la exposición a los compuestos, tanto las células con DMSO como las células tratadas se recogieron y se fijaron en etanol 70% helado. Después, se lavaron las células y se trataron con 0,05% de ARNasa A y tiñeron con yoduro de propidio en PBS durante 30 minutos, y se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) para determinar la distribución del ciclo celular. Unas 50000 células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200µl de solución de tinción (que contiene Anexina V-fluoresceína y yoduro de propidio en HEPES; kit de tinción Anexina V-FLUOS; BD Biosciences). Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y las células se analizaron por citometría de flujo. Este tratamiento permite la discriminación de células vivas (sin teñir) de células apoptóticas (teñidas sólo con Anexina V) y células necróticas (teñidas tanto con Anexina V como con yoduro de propidio).

Los datos del citómetro fueron analizados utilizando el programa asociado al citómetro CellQuest Pro® (BD bioscience). Este programa permite ver el estadio del ciclo celular en el que se encuentran las células. En función de la cantidad de yoduro de propidio de cada célula, la cual es directamente proporcional a la cantidad de ADN que tengan, el programa va a registrar una gráfica en la que en abscisas se representa la cantidad de ADN y en ordenadas el número de células. Tras esto, los archivos fueron analizados con el programa WINMDI el cual permite hacer una discriminación y cuantificación del número de células en cada estado del ciclo celular.

Resultados

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE PANOBINOSTAT® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA

Genotipado de líneas celulares

En nuestro trabajo hemos incluido ocho líneas celulares, seis derivadas de pacientes con cáncer de mama y dos de pacientes con cáncer de colon. Un análisis dirigido mediante PCR y secuenciación por método de *Sanger*, confirmó que estas líneas celulares presentaban las alteraciones genóticas previamente caracterizadas por otros grupos¹³²⁻¹³⁴ y recogidas en la base de datos de *Sanger Institute* (*sanger.ac.uk/*) (tabla 7).

Tabla 7: Relación de líneas celulares incluidas en nuestro trabajo y las mutaciones más relevantes en oncogenes y genes supresores de tumores. (TN: Triple negativo)

	LÍNEA CELULAR	TIPO	GEN/ES MUTADO/S	MUTACIÓN	ALTERACIÓN EN LA PROTEÍNA
Cáncer de mama	<i>hs578t</i>	TN	TP53	c.469G>T	p.V157F
	<i>MDA-MB-231</i>	TN	TP53	c.839G>A	p.R280K
	<i>BT549</i>	TN	PTEN	c.823delG	p.V275fs*1
			RB1	c.265_607del343	p.?
			TP53	c.747G>C	p.R249S
	<i>MCF7</i>	Luminal			
	<i>Sum149pt</i>	TN	BRCA1	c.2169delT;	p.P724fs*12
			TP53	c.711G>A	p.M237I
<i>HCC1937</i>	TN	BRCA1	c.5382insC	p.Q1756fs*74	
		RB1	c.2212_2325del114	p.T738_R775del38	
		PTEN	c.1_1212del1212	p.?	
		TP53	c.916C>T	p.R306*	
Cáncer de colon	<i>HCT116</i>		MLH1	c.755C>A	p.S252*
	<i>HT29</i>		TP53	c.818G>A	p.R273H

Análisis de la inestabilidad de microsatélites

Dado que en nuestro estudio hemos incluido líneas celulares con mutaciones en genes reparadores del ADN como son BRCA1 y MLH1, junto con líneas celulares sin alteraciones conocidas en mecanismos reparadores del DNA, hemos analizado la estabilidad

de los microsatélites BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 y D17S250 en todas las líneas celulares incluidas en nuestro trabajo. Las células se mantuvieron en cultivo durante 8 semanas y se realizó una comparación de las secuencias microsatélites con un control previo. En la tabla 8 se muestra el resultado y se observa que la inestabilidad de microsatélites se detecta sólo en las líneas celulares que presentan mutaciones en los genes reparadores del ADN; MLH1 en el caso de *HCT116* y BRCA1 en el caso de las líneas celulares *HCC1937* y *Sum149pt*.

Tabla 8: Resultado del estudio de inestabilidad de microsatélites en las líneas derivadas de cáncer de colon y mama utilizadas en nuestro trabajo.

	BAT25	BAT26	D5S346	D2S123	D17S250
<i>HT29</i>	estable	estable	estable	estable	estable
<i>HCT116</i>	estable	estable	inestable	inestable	inestable
<i>HCC1937</i>	estable	inestable	inestable	inestable	estable
<i>MCF7</i>	estable	estable	estable	estable	estable
<i>hs578t</i>	estable	estable	estable	estable	estable
<i>MDA-MB231</i>	estable	estable	estable	estable	estable
<i>BT549</i>	estable	estable	estable	estable	estable
<i>Sum149Pt</i>	estable	inestable	estable	estable	inestable

Análisis del efecto de Panobinostat® sobre la acetilación de histonas en líneas celulares tumorales.

El estudio del nivel de acetilación de la histona H3 en las líneas celulares incluidas en nuestro estudio mostró que los niveles de acetilación de esta histona aumentan tras la incubación durante 72 horas con Panobinostat® a una concentración de 50nM. Debemos destacar que las líneas celulares *MCF7*, *Sum149pt* y *hs578t* muestran unos niveles basales de acetilación muy reducidos en comparación con las otras líneas celulares. Estos resultados confirman que Panobinostat® inhibe la actividad de las desacetilasas de histonas (HDAC) (fig. 23).

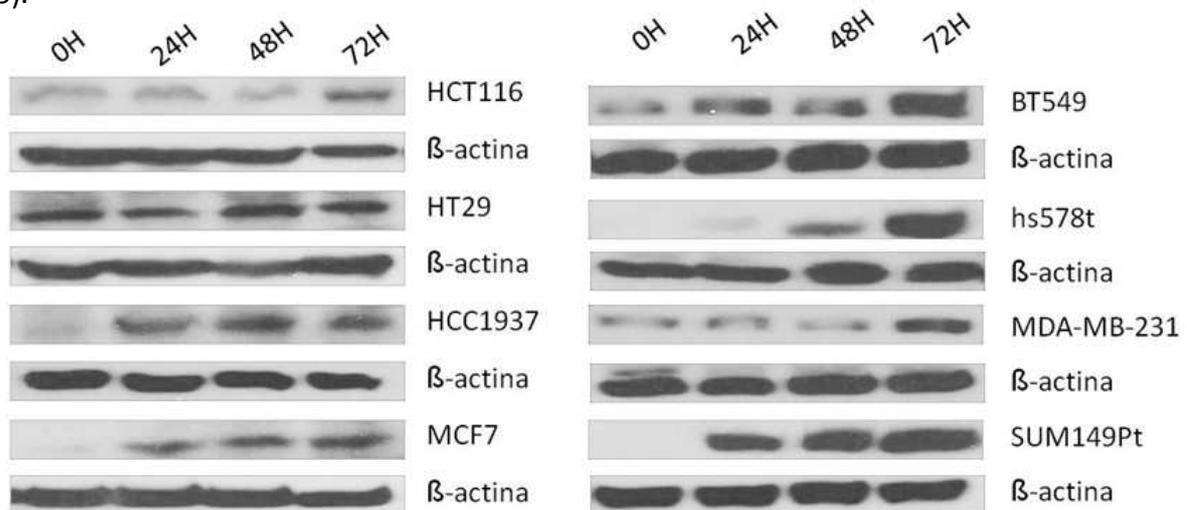
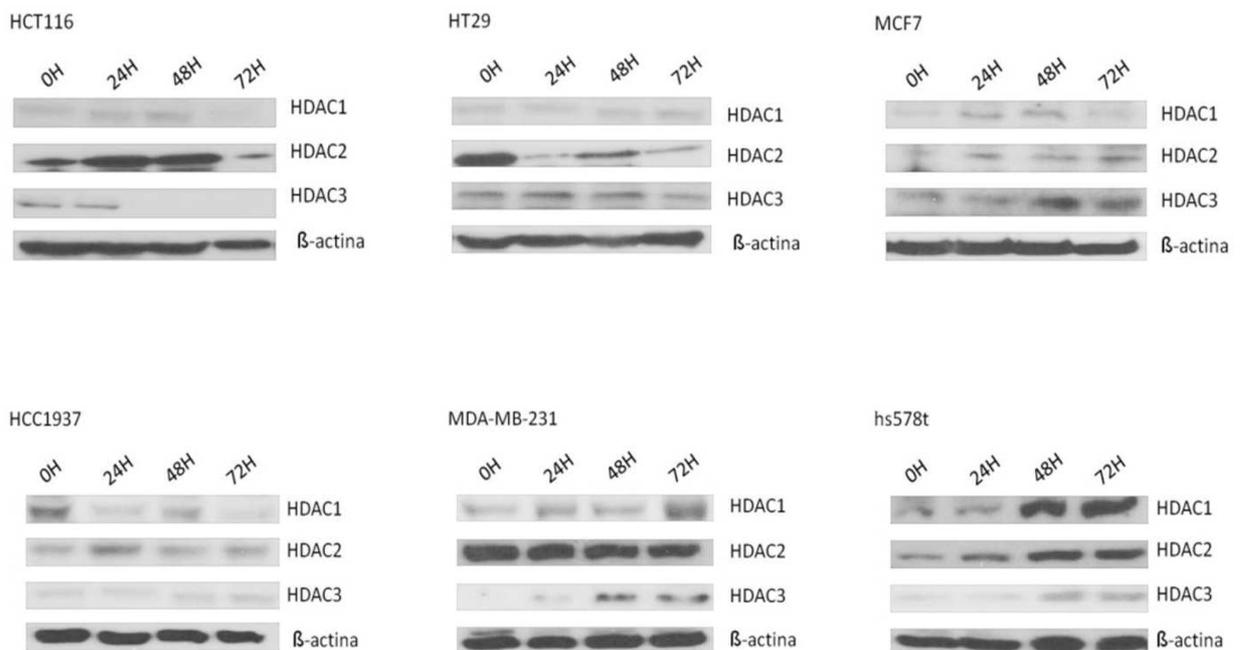


Fig. 23: Western blot mostrando la acetilación de la histona H3 tras el tratamiento durante 72 horas con panobinostat® a una concentración de 50nM.

Análisis del efecto de Panobinostat® sobre la expresión de HDAC en líneas celulares tumorales.

Con el fin de comprobar si los cambios en los patrones de acetilación secundarios a la incubación con Panobinostat® modificaban los niveles de expresión de las proteínas HDAC, estudiamos la expresión de tres proteínas HDAC en las líneas celulares incluidas en nuestro trabajo, comprobando que existe una gran variabilidad en los niveles de las histonas desacetilasas estudiadas (HDAC1, HDAC2 y HDAC3) tanto a nivel basal como tras la incubación con Panobinostat® durante 72 horas a una concentración de 50nM. En las dos líneas celulares derivadas de tumores de colon, *HCT116* y *HT29*, se observó una disminución de los niveles de HDAC2 y de HDAC3, aunque en el caso de *HCT116* los niveles de HDAC2 aumentaron considerablemente en las primeras 48 horas con respecto a la situación basal; en la línea celular *HT29* se comprobó una reducción de los niveles de HDAC2 tras las primeras 24 horas de tratamiento y una leve recuperación de la expresión las siguientes 24 horas. HDAC1 disminuyó su expresión en la línea celular *HCT116* pero no en *HT29*. En las líneas derivadas de cáncer de mama, se observó un aumento de los niveles de todas las proteínas HDAC, excepto en las líneas celulares *HCC1937* y *MCF7* en las que se observó una disminución de HDAC1 (fig. 24).



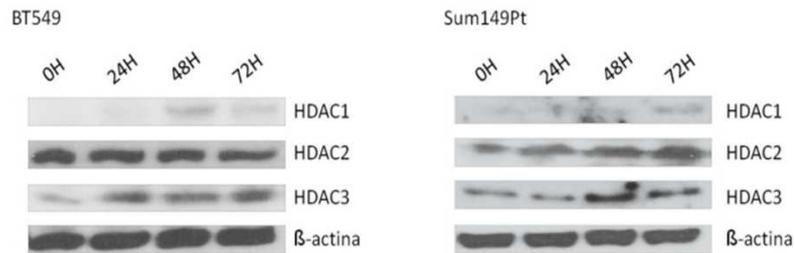


Fig. 24: Western blot mostrando la expresión de HDAC1, HDAC2 y HDAC3 tras el tratamiento durante 72 horas con panobinostat® a una concentración de 50nM en dos líneas de cáncer de colon (HCT116 y HT29) y seis líneas de cáncer de mama.(MCF7, HCC1937, MDA-MB-231, hs578t, BT549 y Sum149pt).

Estudio del efecto de Panobinostat® en la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores colorrectales

El estudio del efecto del Panobinostat® sobre la proliferación celular de las líneas celulares *HTC116* (portadora de una mutación en el gen *MLH1*) y *HT29* (que presenta mutado el gen *p53*) tras incubación con cuatro concentraciones diferentes (50nM, 75nM, 100nM y 150nM) durante 72 horas mostró una inhibición del crecimiento en ambas líneas celulares (Fig. 25). Por otro lado, el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo mostró un incremento de la mortalidad dependiente de la dosis, que se incrementó con el paso del tiempo, siendo más marcada en el caso de la línea celular *HCT116* (fig. 26).

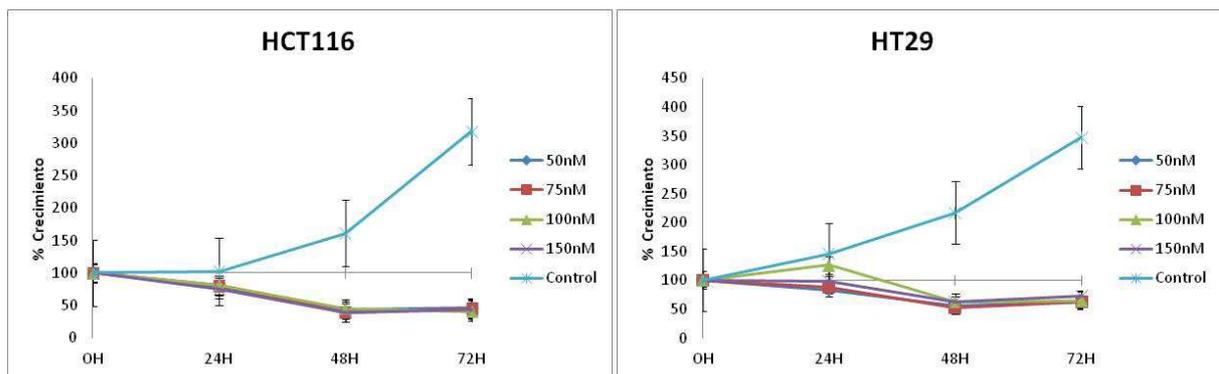


Fig. 25. Análisis de proliferación celular mediante MTT en las dos líneas de cáncer de colon incluidas en nuestro trabajo. Se observa que ambas líneas muestran una susceptibilidad al compuesto con inhibición del crecimiento a todas las concentraciones.

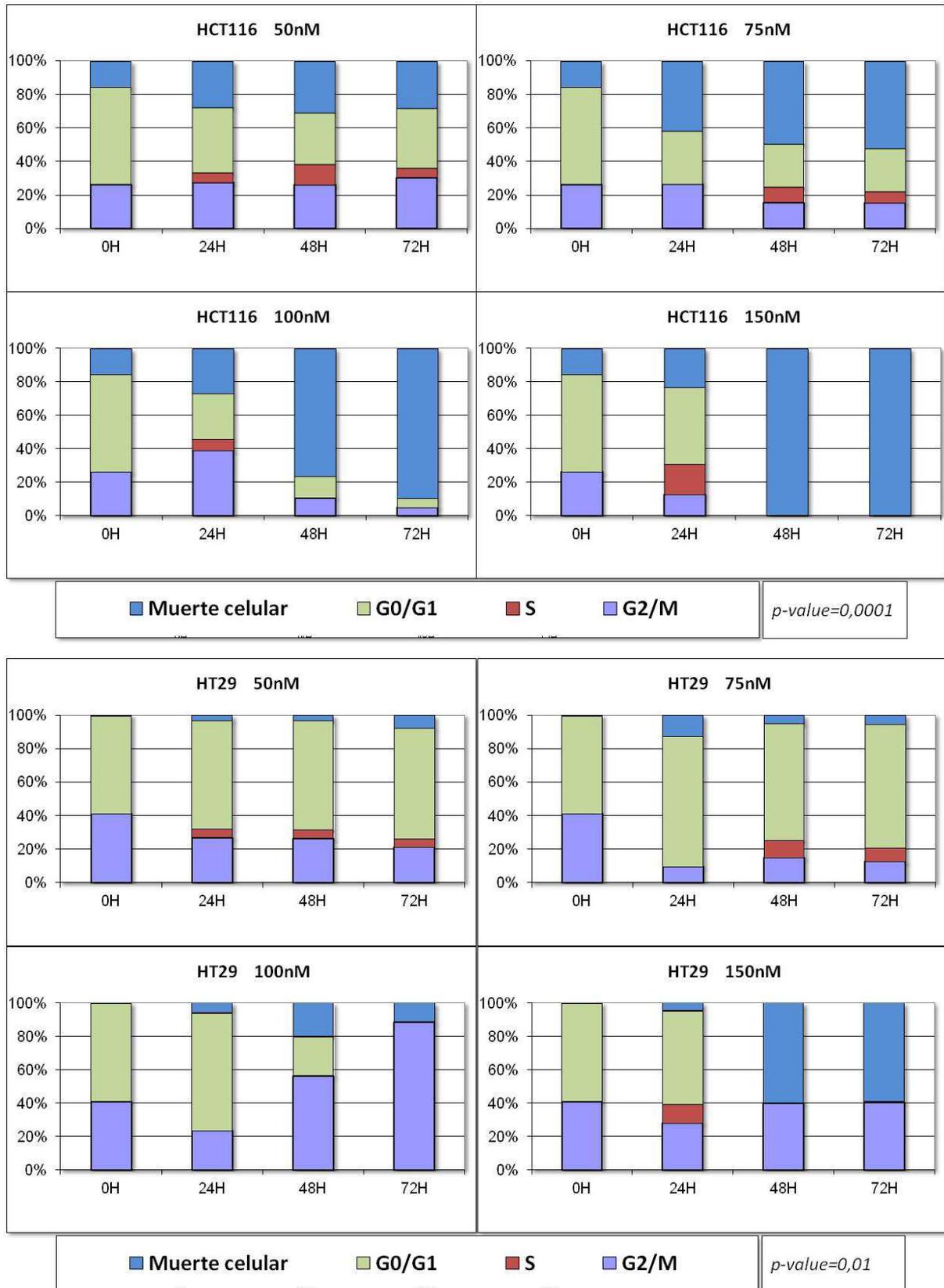


Fig. 26. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en las dos líneas de cáncer de colon. Se observa que HCT116 presenta un gran número de células muertas tras 48h en cultivo con las tres concentraciones más altas, siendo mayor al aumentar el tiempo de exposición. HT29 también es susceptible al compuesto presentando una gran parada en G2/M desde los 48h a 100nM. El *p-value* hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

Estudio del efecto de Panobinostat® en la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores de mama

El análisis de la proliferación celular en respuesta al tratamiento con Panobinostat®, con las mismas concentraciones anteriores, en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama, mostró una respuesta diferente en función del genotipo de cada línea celular. La línea *MCF7* (que no presenta mutación ni en BRCA1 ni en p53) presentó una inhibición del crecimiento a partir de las 24 horas tras la exposición a todas las concentraciones del fármaco empleadas en el estudio; sin embargo, la línea *HCC1937* (que tiene mutados tanto BRCA1 como p53) mostró una menor inhibición del crecimiento (fig. 27).

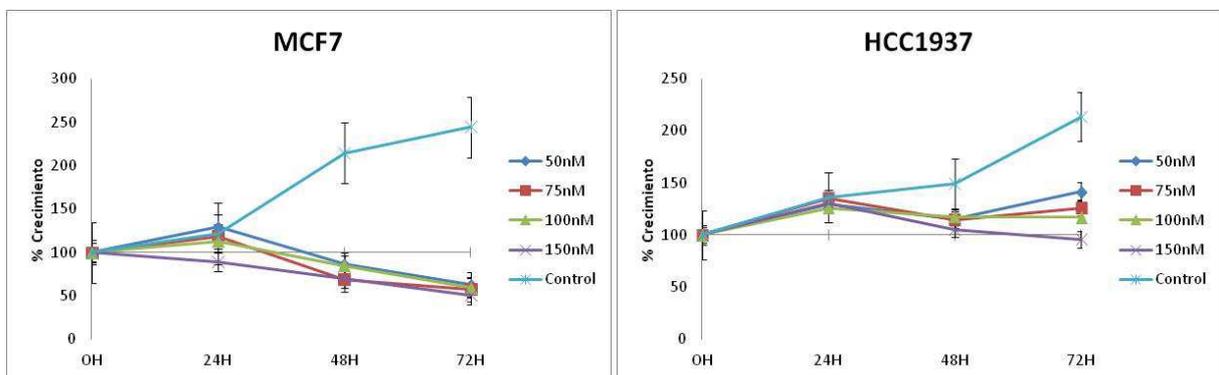


Fig. 27. Análisis de proliferación celular mediante MTT en las dos líneas de cáncer de mama. *MCF7* presenta sensibilidad al compuesto tras las primeras 24 horas de tratamiento. *HCC1937* presenta una ligera inhibición de crecimiento con la concentración mayor, pero es claramente menos sensible con las tres concentraciones más bajas.

El análisis de ciclo celular por citometría de flujo mostró que la línea celular *MCF7* presenta una elevada mortalidad tras la exposición a 150nM de Panobinostat®, comportamiento que no se observa en la línea *HCC1937*, en la que la mayoría de las células se encuentran en fase G0/G1 tras la incubación con el fármaco (fig. 28).

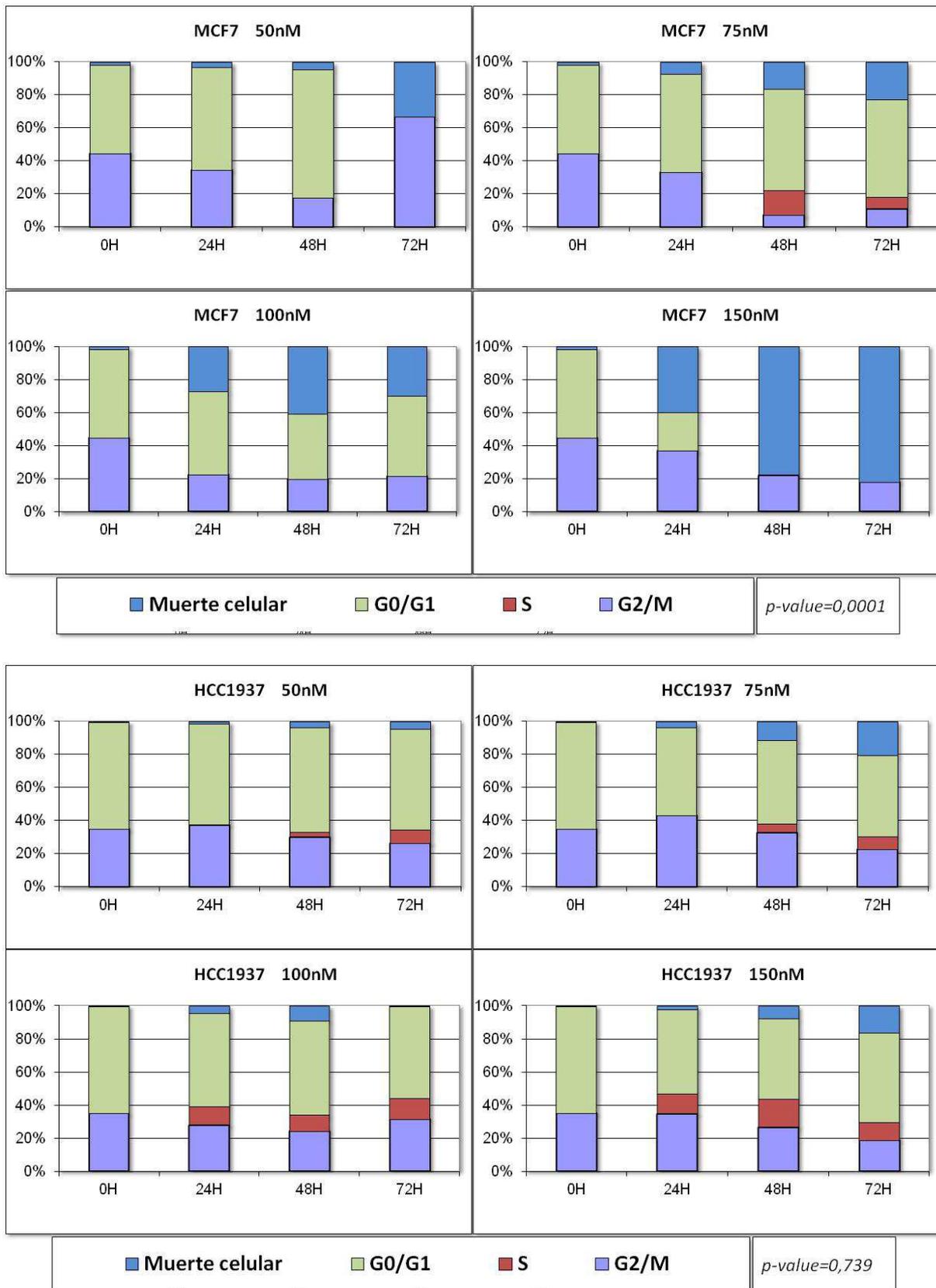


Fig. 28. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en las dos líneas de cáncer de mama. Se observa como la línea MCF7 presenta susceptibilidad al compuesto y dispara su mortalidad cuanto mayor es la concentración. Sin embargo HCC1937 no incrementa su mortalidad a ninguna concentración. El *p-value* hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

Con el fin de comprobar si la presencia de mutaciones en el gen BRCA1, con la consiguiente disfunción de la proteína modificaba la respuesta a Panobinostat®, estudiamos tres líneas celulares derivadas de cáncer de mama triples negativas sin mutación en el gen BRCA1 (*hs578t*, *BT549* y *MDA-MB-231*) y una línea celular triple negativa portadora de mutación en BRCA1 (*Sum149pt*).

El estudio de la proliferación celular en presencia de Panobinostat® mostró una inhibición del crecimiento a partir de las 24 horas de incubación de las líneas celulares *hs578t* y *MDA-MB-231* y una menor inhibición en la línea *BT549* (fig. 29). La línea *Sum149pt* no presentó inhibición del crecimiento en presencia de las diferentes concentraciones de Panobinostat® (fig. 29)

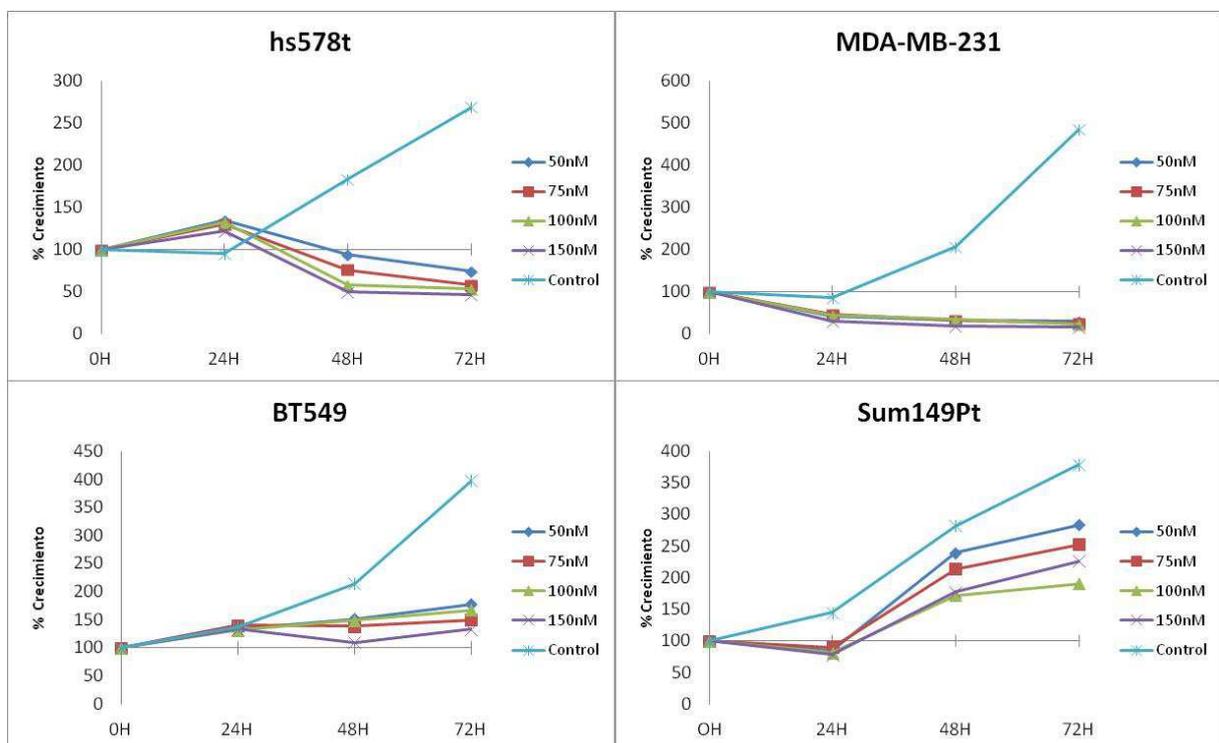


Fig. 29. Análisis de proliferación celular mediante MTT en las tres líneas de cáncer de mama. La línea *MDA-MB-231* presenta una clara inhibición del crecimiento desde el principio del tratamiento. La línea *hs578t* tiene inducido el crecimiento celular durante las primeras 24 horas reduciéndose drásticamente a partir de ese tiempo. Por el contrario la línea *BT549* presenta capacidad proliferativa durante todo el tratamiento. Para la línea de cáncer de mama *Sum149pt* la tasa de crecimiento está se dispara tras 24 horas de tratamiento.

El estudio de ciclo celular mediante citometría de flujo mostró que las líneas celulares *hs578t* y *MDA-MB-231* presentan un incremento de la mortalidad a las 72h a partir de una concentración de Panobinostat® de 75nM, observándose una mayor cantidad de células en fase G2/M en la línea celular *MDA-MB-231* (fig. 30).

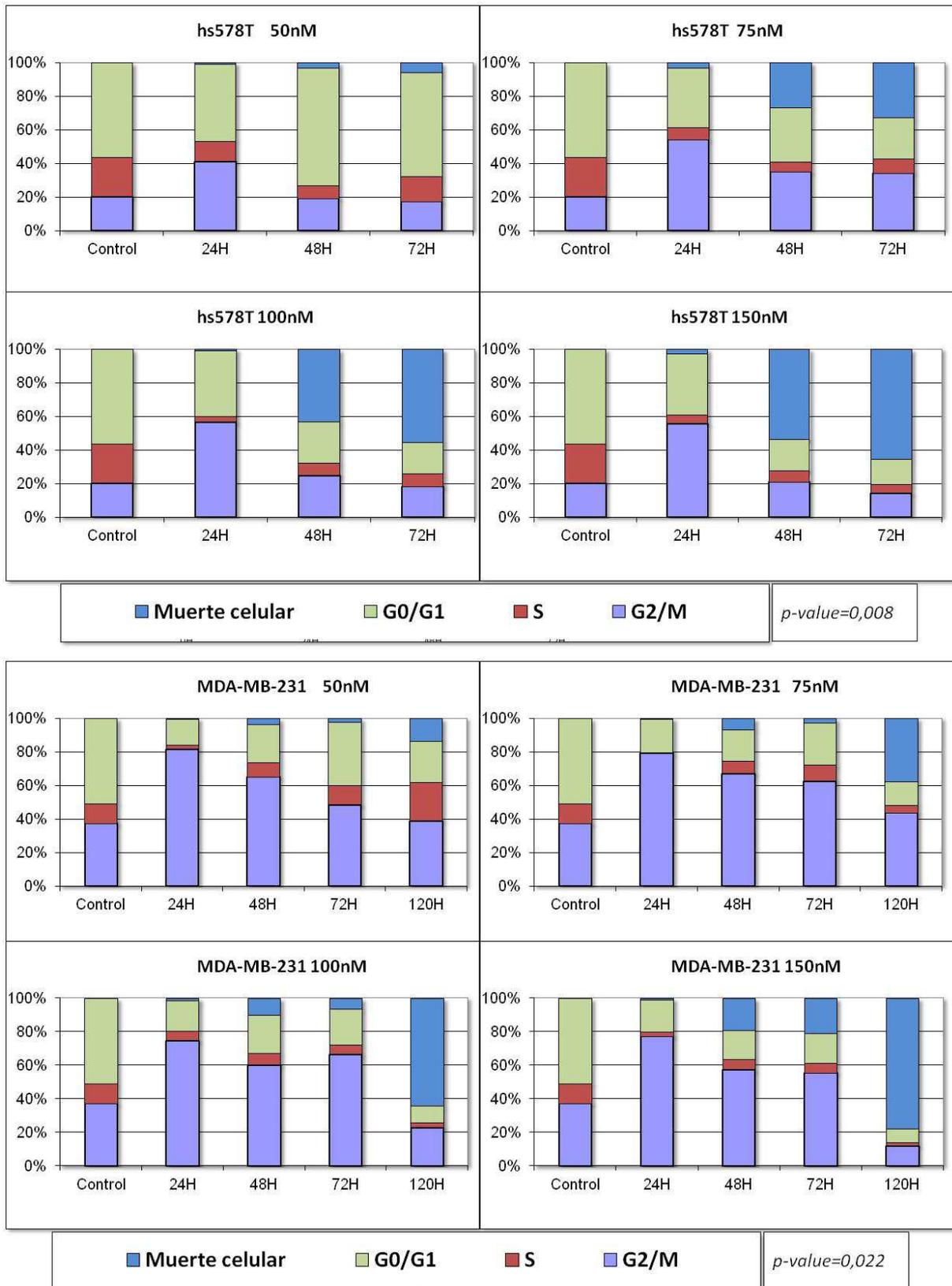


Fig. 30. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas de cáncer de mama hs578t y MDA-MB-231. En hs578t se observa cómo tras 24h en presencia del compuesto hay una marcada parada de ciclo celular en fase G2/M la cual se traduce en incremento de la mortalidad celular 24 horas después. En el caso de MDA-MB-231 a 72 horas aún no se observaba una inhibición de crecimiento. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

El análisis del ciclo celular por citometría de flujo de la línea *BT549* mostró un incremento del número de células paradas en fase G2/M tras la incubación con Panobinostat® que no se traducía en un incremento significativo de la mortalidad ni siquiera tras 120 horas de incubación (fig. 31):

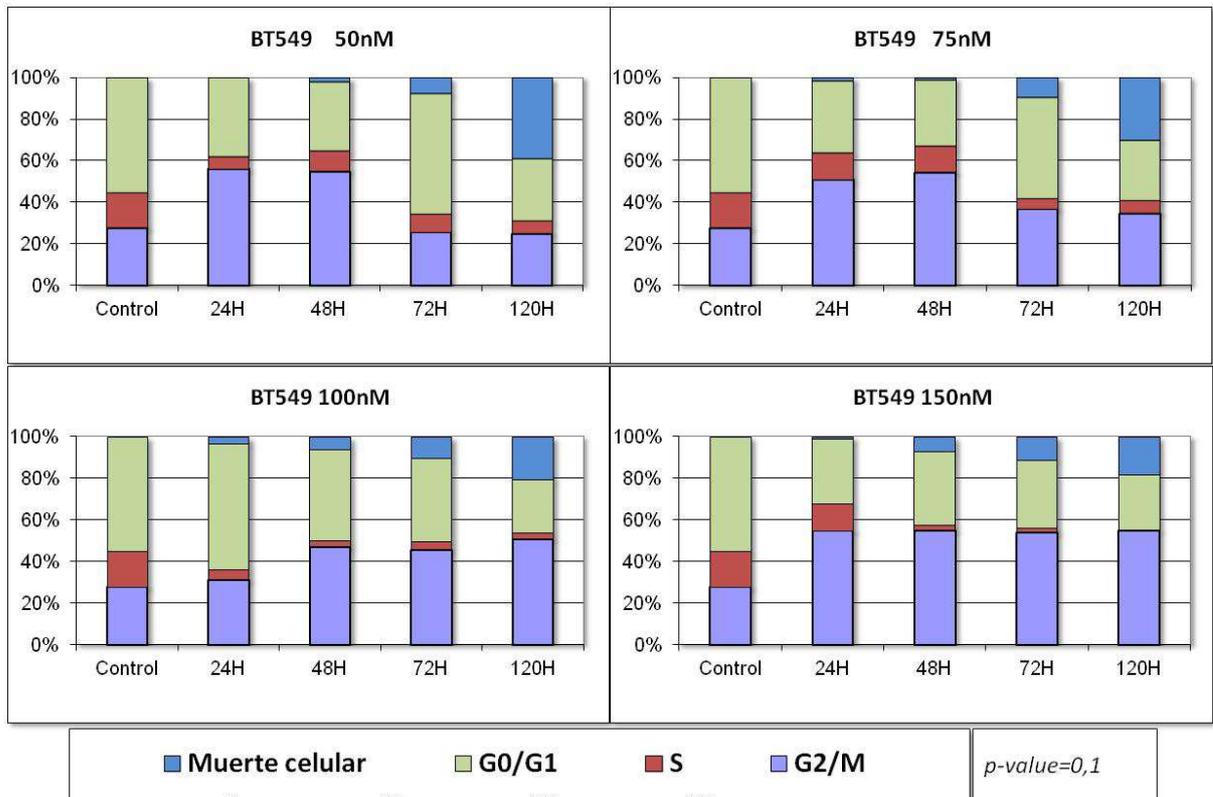


Fig. 31. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en la línea de cáncer de mama *BT549*. Se observa un gran cantidad de células paradas en fase G2/M que no se traduce en mortalidad celular tras 120 horas. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

El estudio del ciclo celular por citometría de flujo de la línea *Sum149pt*, mostró que la incubación con una concentración de Panobinostat® superior a 75nM incrementaba la mortalidad celular a partir de las 48h, lo que contrasta con el estudio de proliferación celular en el que no encontramos respuesta a las diferentes concentraciones del fármaco (fig. 32).

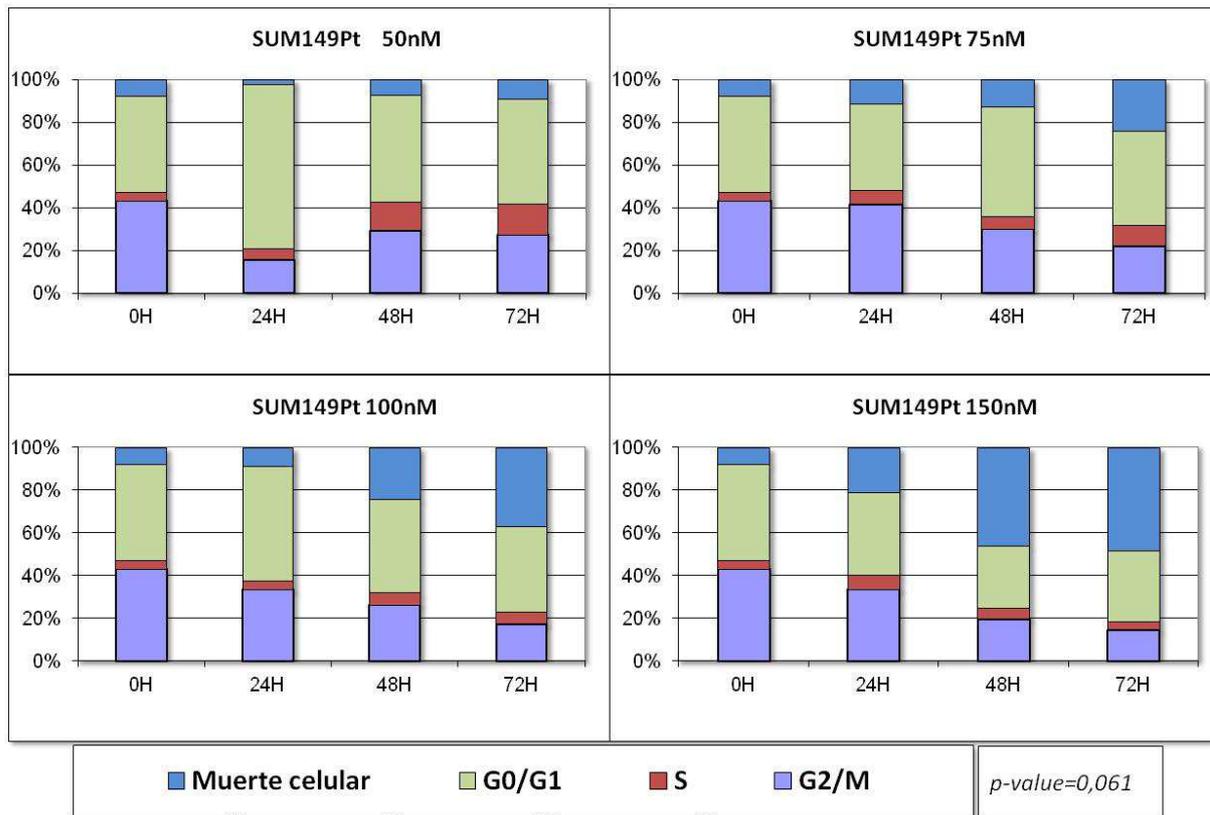


Fig. 32. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en la línea de cáncer de mama Sum149pt. Observamos como existe un incremento de la mortalidad a 72 horas en presencia del fármaco. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

Análisis de la expresión de proteínas del ciclo celular en respuesta al tratamiento con Panobinostat®

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio y por otros grupos¹³⁵⁻¹³⁷ demuestran que Panobinostat® tiene un efecto directo sobre la supervivencia celular, regulando la progresión del ciclo, probablemente debido a que la inhibición de las histonas desacetilasas afecta directamente a un gran número de proteínas, entre ellas HDAC3 y HDAC6, que dirigen a la degradación de las proteínas Aurora quinasa A (AURKA) y Aurora quinasa B (AURKB)^{135,137,138}, que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la mitosis y en la formación del huso mitótico, de manera que sin ellas la mitosis es aberrante y no se produce el ensamblaje de los microtúbulos a los cromosomas en metafase. En nuestro trabajo hemos analizado el efecto de Panobinostat® sobre la expresión de estas dos proteínas reguladoras en las dos líneas de cáncer de colon y en seis líneas de cáncer de

mama. Como se observa en la fig. 33, los niveles de AURKA y AURKB disminuyen tras 72 horas de incubación con Panobinostat® a una concentración de 50nM.

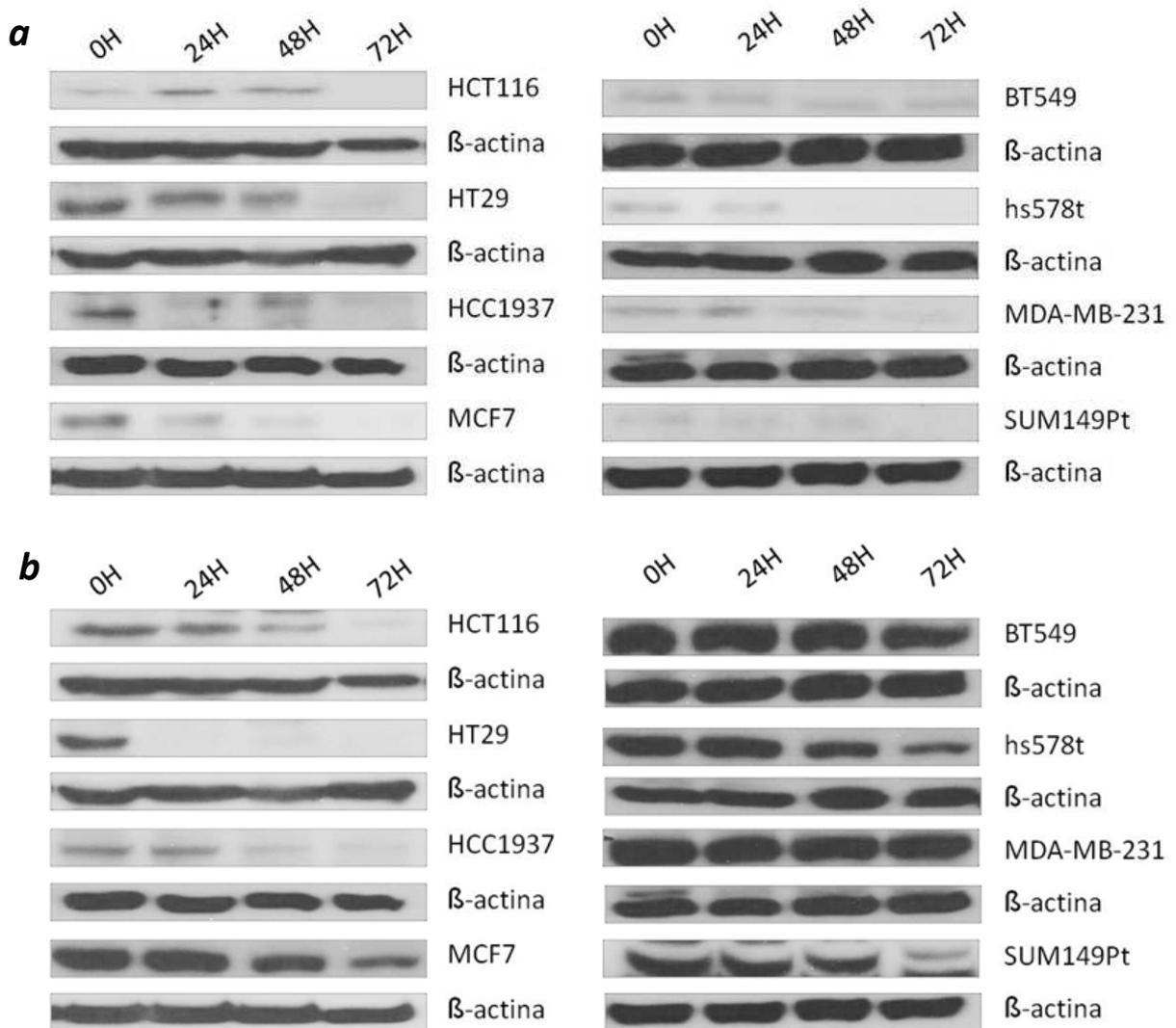


Fig. 33: Western blot mostrando la expresión de Aurora quinasa A (fig. a) y Aurora quinasa B (fig. b) tras el tratamiento durante 72 horas con panobinostat® a una concentración de 50nM.

Análisis global del proteoma en líneas celulares derivadas de cáncer de mama y colon en respuesta al tratamiento con Panobinostat®

El análisis mediante electroforesis bidimensional del proteoma de las líneas celulares *HCT116* y *HT29* derivadas de tumores de colon y *BT549* y *hs578t* derivadas de cáncer de mama, tras tratamiento durante 72 horas con Panobinostat® a una concentración de 50nM, mostró cambios cuantitativos que se presentan en las tablas 8, 9, 10 y 11:

Tabla 8: Relación de proteínas sobreexpresadas tras 72h de tratamiento con panobinostat® en la línea HCT116. El Ratio marca la diferencia en tanto por 1 de la comparación. El ensayo no permitió detectar proteínas infraexpresadas.

HCT116	Proteína	Ratio
Sobreexpresadas	<i>Pyruvate dehydrogenase e1 component subunit alpha</i>	2.79
	<i>Ornithine aminotransferase</i>	0.64
	<i>Ras gtpase-activating protein-binding protein 1</i>	1.68

Tabla 9: Relación de proteínas sobreexpresadas e infraexpresadas en la línea HT29 comparada con el control T0 tras 72h de tratamiento con panobinostat®. El Ratio marca la diferencia en tanto por 1 de la comparación.

HT29	Proteína	Ratio
Infraexpresadas	<i>Cofilin-1</i>	-1.88
	<i>Malate dehydrogenase mitochondrial</i>	-2.28
	<i>Aldo-keto reductase family 1 member C3</i>	-1.36
	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	-1.43
	<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>	-1.47
	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	-1.59
	<i>Glycyl-tARN synthetase</i>	-1.47
	<i>T-complex protein 1</i>	-1.44
	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial</i>	-1.48
	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	-1.43

HT29	Proteína	Ratio
Sobreexpresadas	<i>Peroxiredoxin-1</i>	0.64
	<i>ADP-ribosylation factor-like protein</i>	0.51
	<i>Gamma-enolase</i>	0.61

Tabla 10: Relación de proteínas sobreexpresadas e infraexpresadas en la línea hs578t comparada con el control T0 tras 72h de tratamiento con Panobinostat®. El Ratio marca la diferencia en tanto por 1 de la comparación.

hs578t	Proteína	Ratio
Infraexpresadas	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>	-1.41
	<i>Heat shock protein beta-1</i>	-2.99
	<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>	-1.57
	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	-1.58
	<i>Spermidine synthase</i>	-2.13

	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	-1.87
	<i>Histone-binding protein RBBP7</i>	-2.36
	<i>Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial</i>	-1.49
	<i>ATP syntetase subunit alpha, mitochondrial</i>	-1.81
	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa</i>	-1.73
	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	-2.94
	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	-1.56
	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	-1.86
	<i>Tubulin beta chain</i>	-1.41
hs578t	Proteína	Ratio
Sobreexpresadas	<i>Proteasome subunit beta type-1</i>	1.87
	<i>Triosephosphate isomerase</i>	1.55
	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	1.43
	<i>Annexin A5</i>	1.27
	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	1.53
	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1.79
	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	2.67
	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	1.47
	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>	3.08
	<i>Moesin</i>	4.03
	<i>3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial</i>	1.90
	<i>Ribonuclease inhibitor</i>	1.91
	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	1.91

Tabla 11: Relación de proteínas sobreexpresadas e infraexpresadas en la línea BT549 resistente al tratamiento con el compuesto comparada con el control T0 tras 72h de tratamiento con Panobinostat®. El Ratio marca la diferencia en tanto por 1 de la comparación.

BT549	Proteína	Ratio
Infraexpresadas	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>	-1.74
	<i>Calcyclin-binding protein</i>	-1.49
	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</i>	-1.62
	<i>Uroporphyrinogen decarboxylase</i>	-1.57
	<i>Twinfilin-2</i>	-1.40
	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	-1.25
	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>	-2.17
	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T</i>	-0.51
	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>	-0.98

BT549	Proteína	Ratio
Sobre- expresadas	<i>Triosephosphate isomerase</i>	1.97
	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>	1.52
	<i>Gelsolin</i>	3.08
	<i>Cathepsin</i>	1.17

El análisis las proteínas cuya expresión se modifica en dos líneas de mama mostró que la *triosafosfato isomerasa* está sobreexpresada en ambas. Esta enzima está implicada en la glucólisis y se ha visto que está sobreexpresada en muchos tumores de mama¹³⁹, en adenocarcinoma de pulmón¹⁴⁰ y en carcinoma de células escamosas de vejiga¹⁴¹.

Por otra parte, como mostramos en la fig. 34, la mayoría de las proteínas cuya expresión se modifica en respuesta al tratamiento con Panobinostat® interfieren en la regulación del metabolismo, principalmente glucídico.

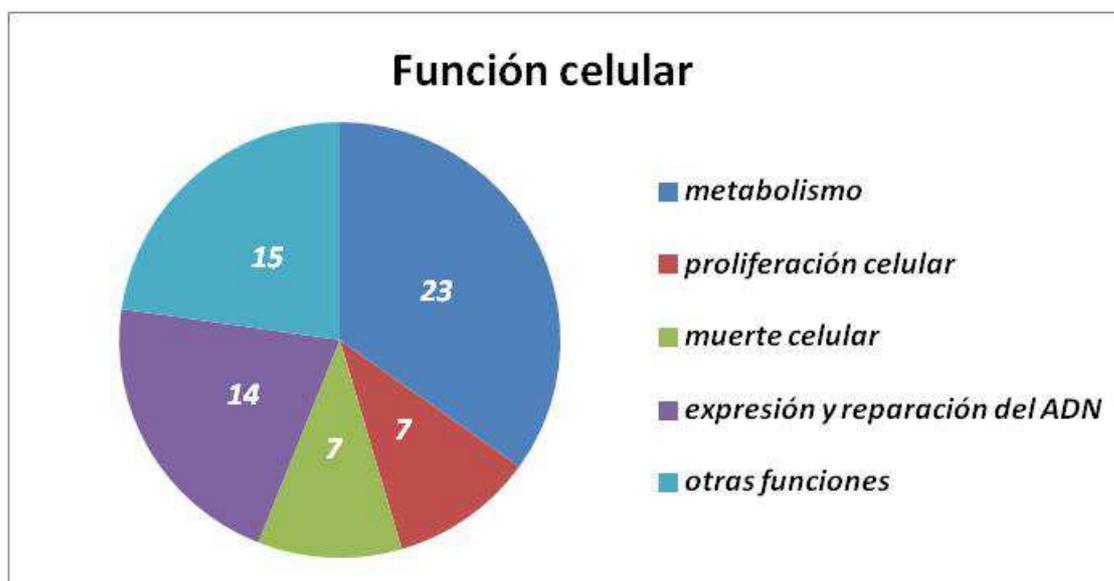


Fig. 34: Relación de proteínas desreguladas agrupadas según su función celular. La mayor parte de las proteínas que agrupamos en el sector de "metabolismo", grupo mayoritario, forman parte del metabolismo glucídico. En el grupo de proteínas "otras funciones" agrupamos proteínas de actividades muy diversas.

No obstante, al agrupar las proteínas observamos que el 42% tienen relación con el ciclo celular y la proliferación ("proliferación celular", "muerte celular" y "transcripción y reparación del ADN").

Por otro lado, al agrupar las proteínas desreguladas tras la incubación con Panobinostat® en función de su localización celular, observamos que casi la mitad son citoplasmáticas, lo que concuerda con que la mayoría de las proteínas desreguladas intervienen en el metabolismo de glúcidos, que tiene lugar entre la mitocondria y el citoplasma (fig. 35).

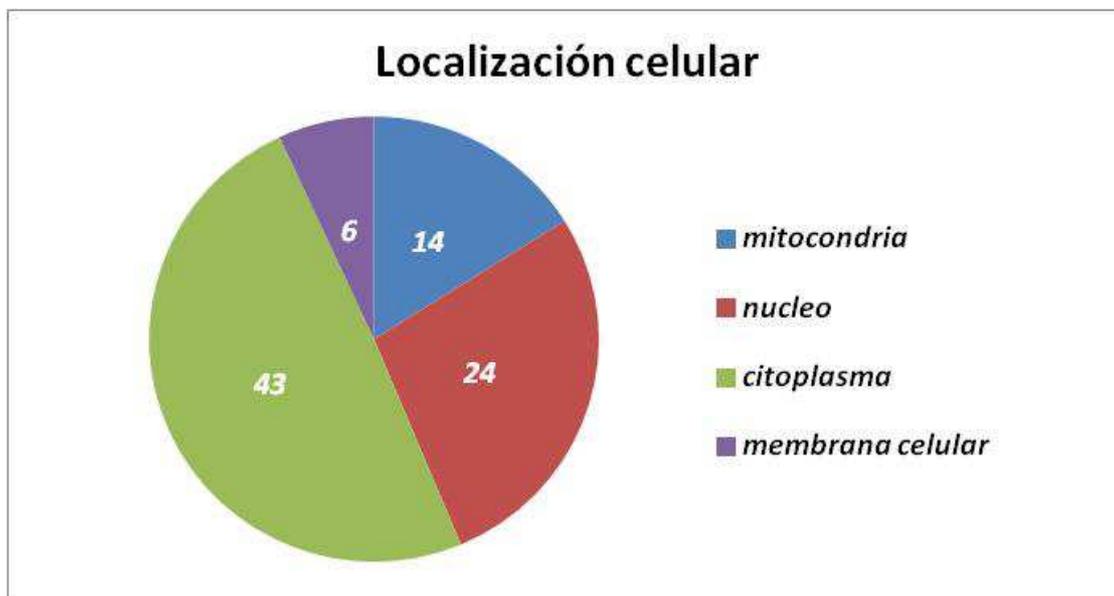


Fig. 35: Relación de proteínas desreguladas agrupadas en función de la localización celular. La mayor parte de las proteínas se agrupan en el sector de "citoplasma" y en su mayoría corresponden con proteínas del metabolismo glucídico. El resto engloba localización nuclear, mitocondrial y membranal.

Análisis de los niveles de ácido láctico en el cultivo celular

A la vista de los resultados anteriores, analizamos los niveles de ácido láctico en los cultivos celulares para tratar de determinar si Panobinostat®, al afectar a los niveles de proteínas relacionadas con el metabolismo glucídico, modifica los niveles de ácido láctico-. Para ello tratamos con Panobinostat® a una concentración de 50nM dos líneas celulares de cáncer de colon, una con MLH1 mutado y otra germinal, y dos líneas de cáncer de mama, una con BRCA1 mutado y la otra germinal durante 72 horas tomando muestras celulares y del medio de cultivo cada 24 horas. Como control negativo utilizamos las mismas líneas celulares sin tratar. Los resultados reflejan que no existen diferencias importantes entre las muestras y sus controles. Los niveles de ácido láctico tras el tratamiento con Panobinostat® son discretamente menores que en los controles pero esta diferencia no resulta relevantes (fig. 36 y tabla IV de Anexo 2).

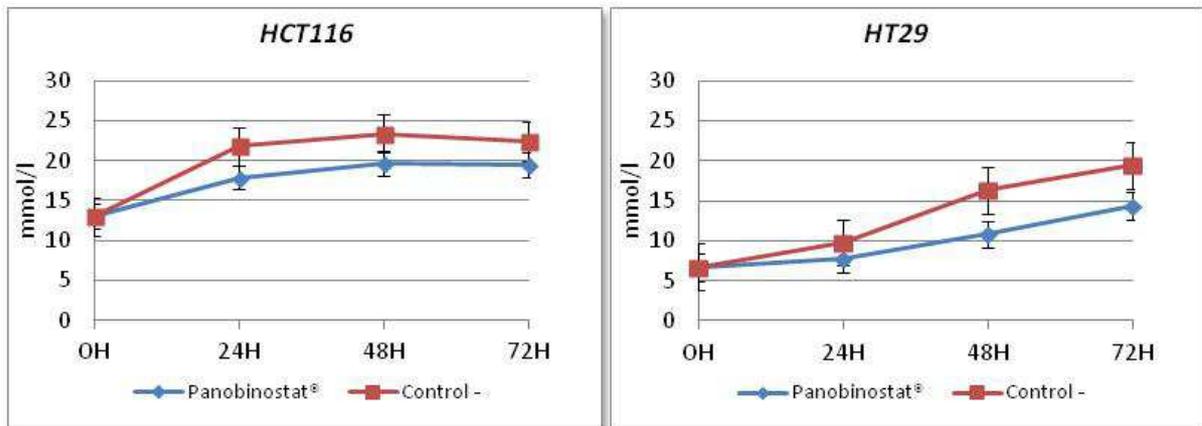
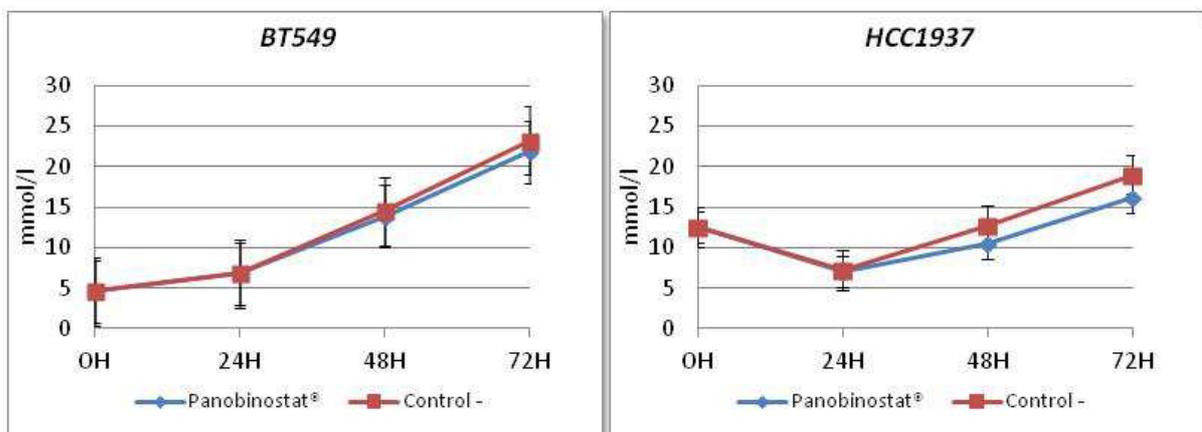
a**b**

Fig. 36: Representación gráfica de la modificación de los niveles de ácido láctico en los cultivos de las líneas celulares derivadas de cáncer de colon HCT116 y HT29 (a) y de cáncer de mama BT549 y HCC1937 (b) en las que no se observan variaciones significativas respecto las células sin tratamiento

Análisis de la regulación de la expresión de miARNs en líneas celulares tumorales incubadas con Panobinostat®

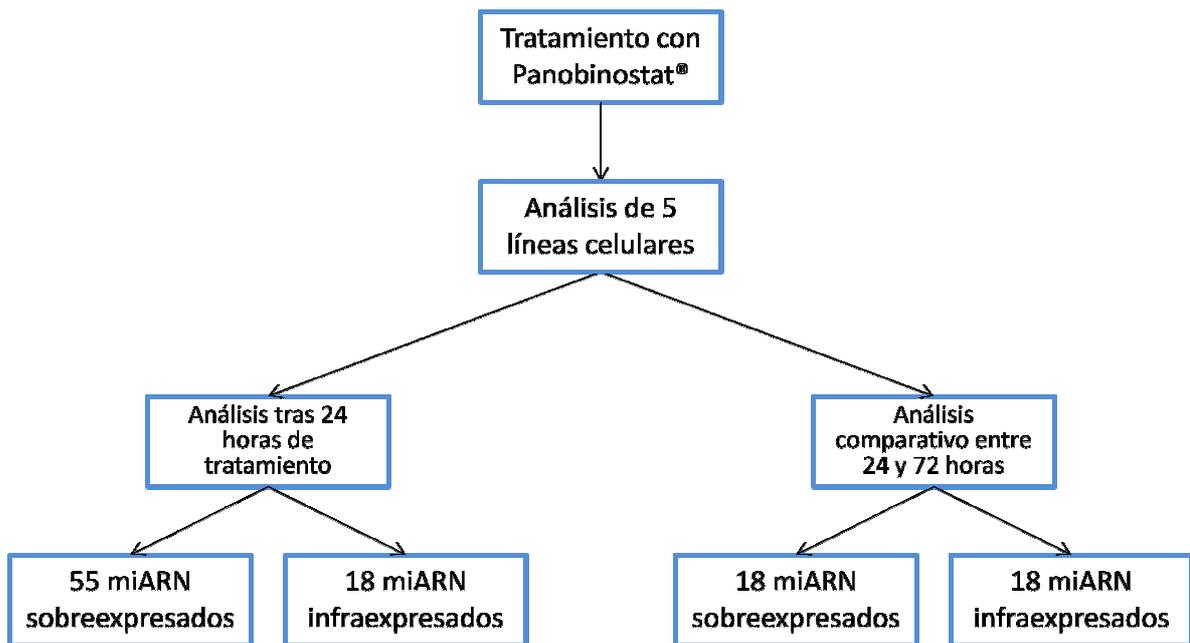
Realizamos el análisis de la expresión de miARNs tras la incubación con Panobinostat® a una concentración de 50nM, de tres líneas celulares derivadas de tumores epiteliales (*HCT116*, *HT29* y *HCC1937*) y dos líneas de tumores hematológicos (*H929* y *MM1S*). Con ello, tratamos de determinar si existen similitudes en la respuesta de las 5 líneas ya que Panobinostat® se utiliza actualmente como tratamiento de primera línea en tumores hematológicos.

El análisis mostró que el fármaco es capaz modificar la expresión de un extenso grupo de miARNs independientemente de la estirpe celular del tumor. Al comparar la variación de los niveles de expresión basales y tras 24 horas de incubación con el fármaco se

observó que 55 miARNs presentan un aumento en los niveles de expresión y 18 miARNs una reducción (tabla 12 y tabla I de Anexo 1).

Por otra parte, al comparar las variaciones en la expresión tras 72h de incubación con Panobinostat® se observó aumento de la expresión en 18 miARN y disminución en otros 18 (tabla 12 y tabla II de Anexo 1).

Tabla 12. Enumeración de miARN sobreexpresados e infraexpresados comunes a todas las líneas celulares tras el tratamiento con Panobinostat® durante 24 horas y comparación tras 24 y 72 horas de tratamiento.



Un análisis de agrupamiento jerárquico de todos los perfiles de miARNs desregulados utilizando el software *Expander* mostró dos grupos bien diferenciados de expresión que corresponden con los miARNs sobreexpresados e infraexpresados que presentan diferencias estadísticamente significativas (fig. 37).

En el estudio de las posibles dianas, seleccionamos exclusivamente dianas confirmadas experimentalmente por otros grupos y aquellas que tienen una alta probabilidad de estar reguladas por los miARNs cuya expresión estaba modificaba. Con el software *Ingenuity®* (Qiagen), determinamos qué genes son susceptibles de desregulación debido a la modificación de los niveles de miARNs y seleccionamos cuales tienen un papel fundamental en rutas de proliferación y control de la apoptosis (Fig. 37). Como consecuencia, el incremento o la reducción de los niveles de estas proteínas puede influir en

los índices de progresión tumoral o reactivar rutas de muerte celular que se encontraran silenciadas.

El agrupamiento que hace el software muestra dos grupos de miARNs que corresponden con aquellos que se infraexpresan (color verde) y se sobreexpresan (color rojo) tras la comparación entre 24 y 72 horas. Así mismo, este agrupamiento coincide con los dos grupos de muestras analizadas, líneas celulares tratadas durante 24 horas y durante 72 horas. Bajando un nivel en el árbol de agrupamiento jerárquico, clasificamos los miARNs por dianas comunes a cada grupo; sin embargo, analizando la jerarquía de las muestras, no se observan diferencias en los grupos según el tipo de tumor, aparecen todos mezclados sin diferenciación de epiteliales por un lado y hematopoyéticos por otro (fig. 37).

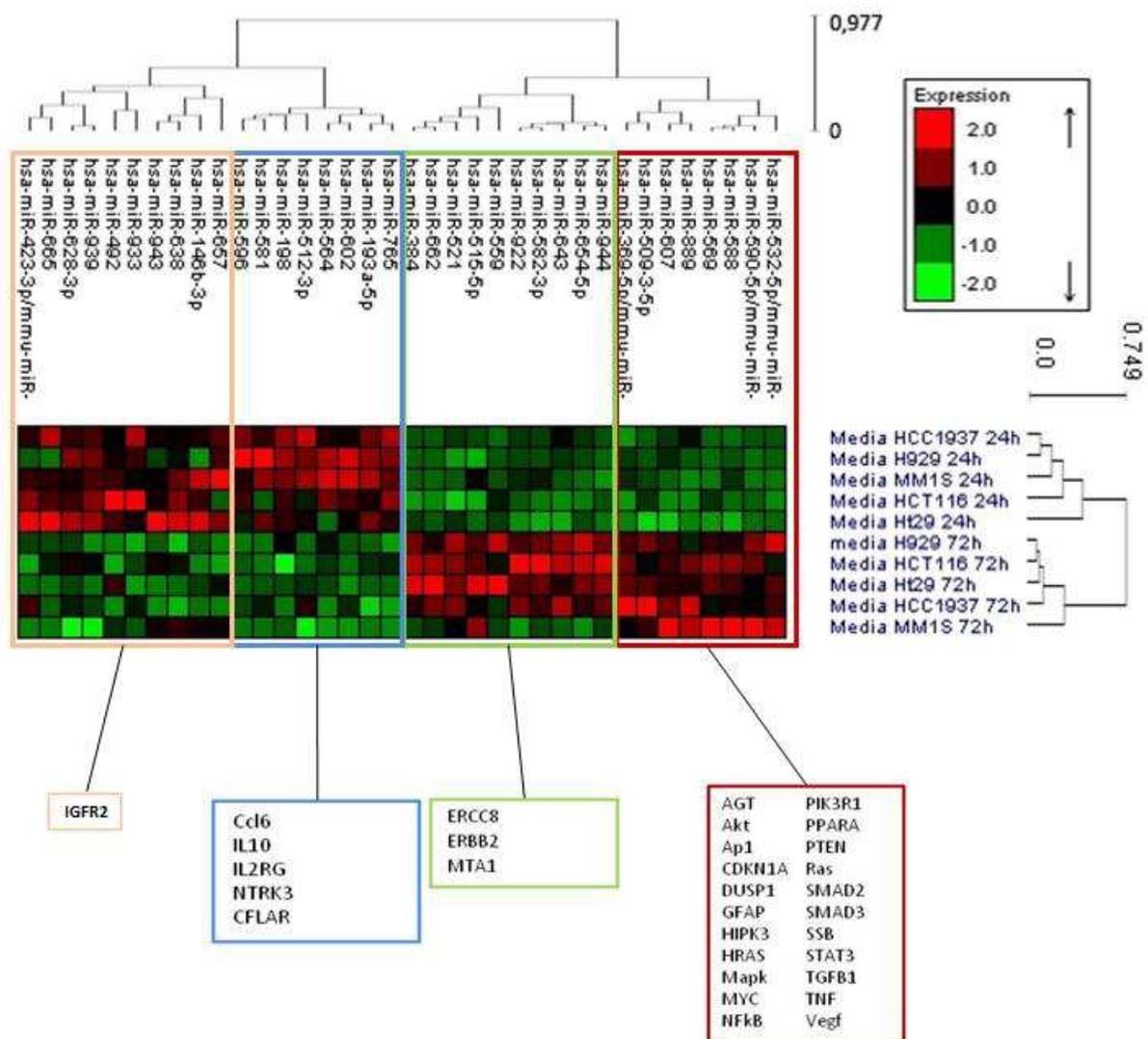
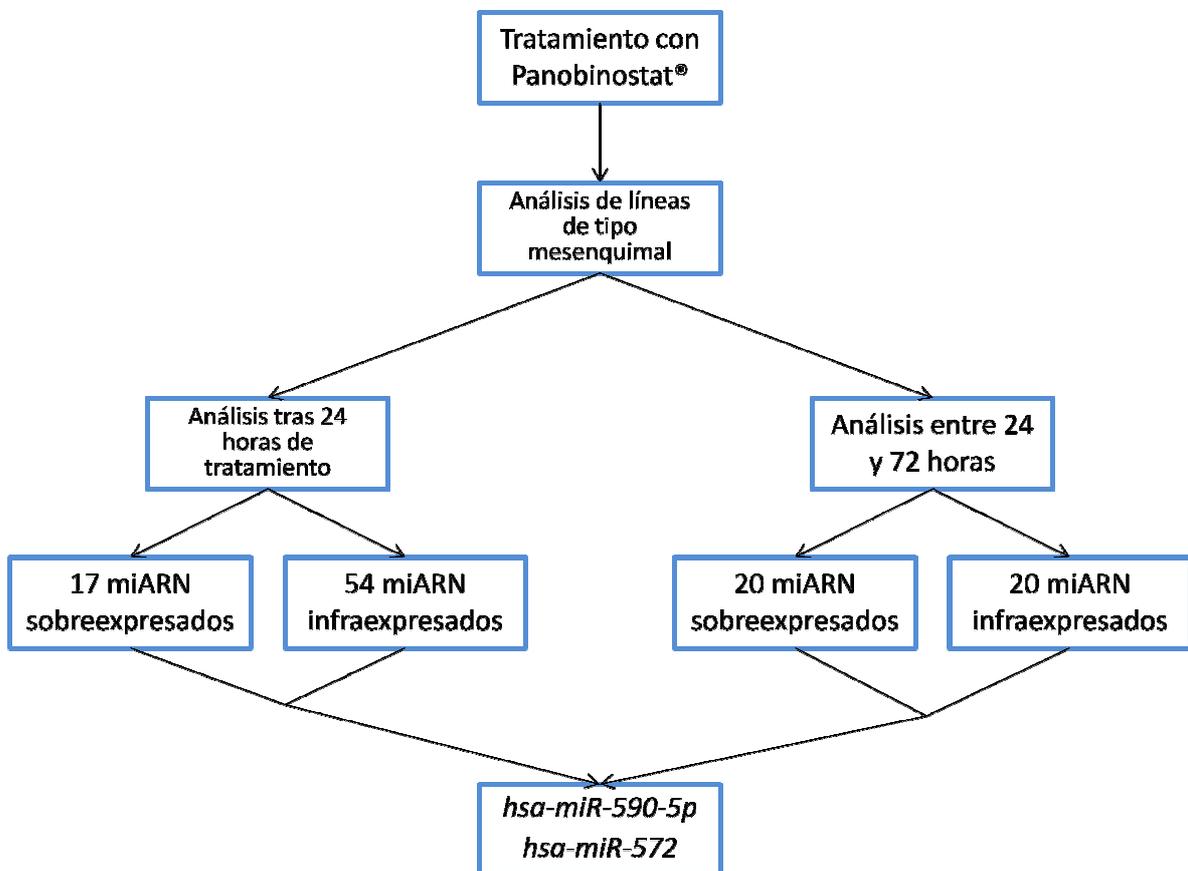


Fig. 37. Análisis de expresión de miARNs de todas las líneas celulares incluidas en nuestro trabajo. Matriz de expresión y análisis de agrupamiento según el método de rangos de Spearman de los miARNs desregulados tras el tratamiento con Panobinostat® en todas las líneas celulares. Los colores (naranja, azul, verde y rojo) representan los 4 grupos que hemos analizado para determinar las dianas y el análisis funcional de cada uno de los grupos de la matriz.

Análisis de los patrones de expresión de miARN en líneas celulares hematológicas y líneas celulares epiteliales en respuesta Panobinostat®

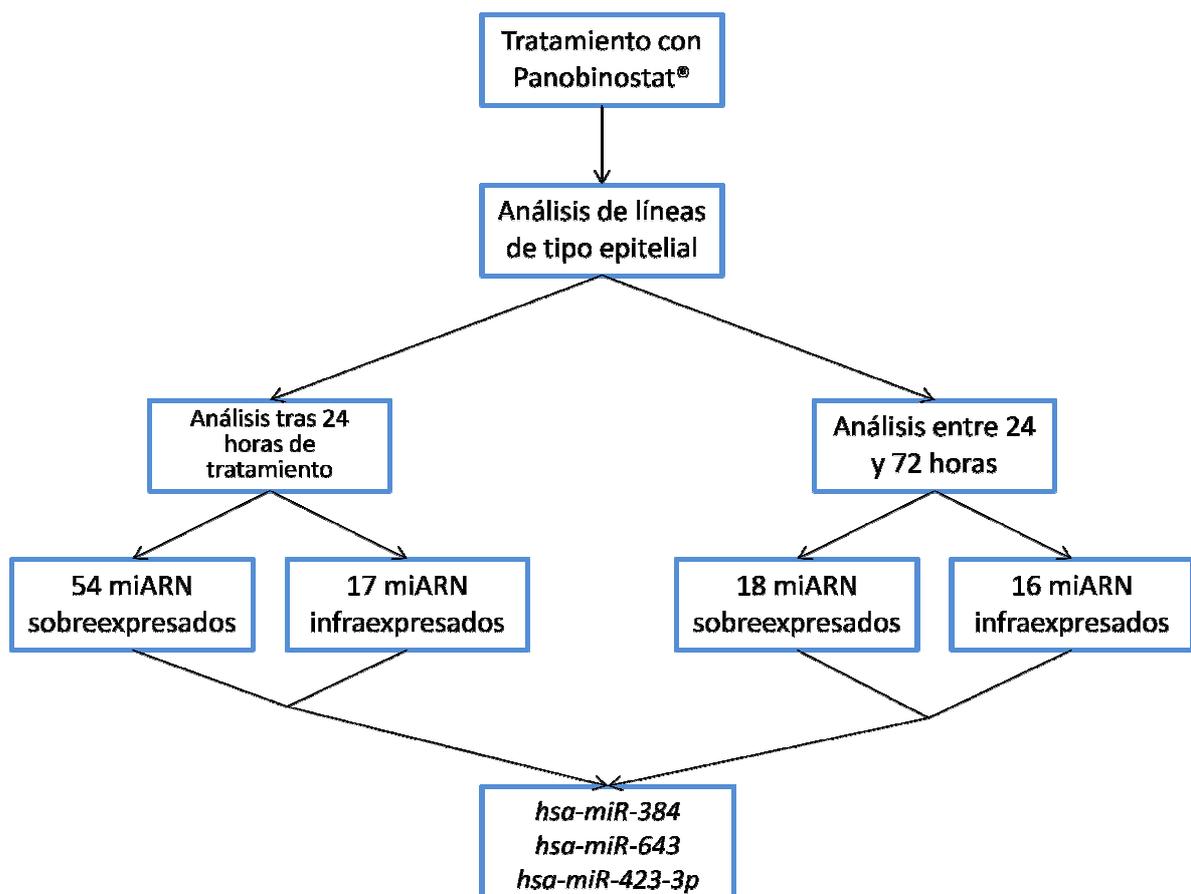
El estudio de los perfiles de expresión de miARNs en líneas celulares derivadas de un tumor hematopoyético como el mieloma múltiple y dos tumores sólidos como cáncer de mama y cáncer de colon tras la incubación con Panobinostat® a 24 y 72 horas mostró que las líneas celulares derivadas de mieloma múltiple presentaban un grupo de miARNs sobreexpresados a las 24 y 72 horas de exposición al fármaco (tabla 13 y tabla IIIa de Anexo 1), pudiendo destacar el *hsa-miR-590-5p*, que tiene como diana el receptor TGF-βR2 y podría estar implicado en la regulación de rutas de proliferación celular. Así mismo, hemos observado otro grupo de miARNs cuya expresión disminuye tras las 72 horas de tratamiento; entre ellos cabe destacar el miARNs *hsa-miR-572* que regula el gen p21 y cuya función está relacionada con mecanismos de proliferación y oncogénesis. Del resto de miARNs no hay actualmente evidencias experimentales de cuáles son las dianas (tabla 13 y tabla IIIa de Anexo 1).

Tabla 13. Enumeración de miARN sobreexpresados e infraexpresados en líneas celulares de origen mesenquimal tras el tratamiento con Panobinostat® durante 24h y comparación tras 24 y 72 horas de tratamiento.



El estudio de las líneas celulares derivadas de tumores sólidos reveló también variaciones en los niveles de expresión de miARNs tras la incubación con Panobinostat® a 24 y 72 horas (tabla 14 y tabla IIIb de Anexo 1). Dentro del grupo de miARNs sobreexpresados cabe destacar *hsa-miR-384*, que regula al receptor de la neurotrofina kinasa 3 y podría intervenir en el control de procesos de crecimiento y desarrollo celular; *hsa-miR-643* regula la expresión del receptor de Estrógenos ER α , que tiene una gran importancia en el cáncer de mama¹⁴². Entre los miARNs cuya expresión disminuye podemos destacar *hsa-miR-423-3p*, que muestra una ligera disminución de su expresión a 72 horas pero no a 24 y regula a CDKN1A junto con otras dianas KIF2C, TATDN2, ATXN7, PAPD7, NACC2, PUM1, SLC11A2, ZC3H4, ESRRA, RAP2C implicadas en procesos muy heterogéneos dentro de la célula (tabla 14 y tabla IIIb de Anexo 1). Del resto de miARNs no hay evidencias experimentales actuales sobre cuáles son las dianas.

Tabla 14. Enumeración de miARN sobreexpresados e infraexpresados en líneas de origen epitelial tras el tratamiento con Panobinostat® durante 24 horas y comparación tras 24 y 72 horas de tratamiento.



Al comparar todas las variaciones de la expresión de miARNs entre las líneas celulares derivadas de mieloma (de origen mesenquimal) y las de los tumores sólidos de colon y mama (de origen epitelial), tras la incubación con 50nM de Panobinostat® durante 24 y 72 horas, realizando un test SAM (*Significance analysis of microarrays*) de dos vías de datos desemparejados, observamos que existen tres grupos de miARNs: específicos de las líneas celulares de origen mesenquimal, de las líneas de origen epitelial y comunes a las dos estirpes celulares (tabla 15 y fig. 38).

Tabla 15. Relación de miARN sobreexpresados e infraexpresados al comparar las líneas celulares de origen epitelial y mesenquimal tras el tratamiento con Panobinostat® durante 24 y 72 horas. q-value hace referencia a la probabilidad de encontrar falsos positivos. a. La comparación no mostró resultados significativos de miARNs infraexpresados a 24 horas.

Tipo Mesenquimal vs. Tipo Epitelial

a. Sobreexpresados (24h)

Nombre	Fold change	q-value(%)
hsa-miR-142-3p	5495.918	0
hsa-miR-142-5p	379.424	0
hsa-miR-597	117.408	0

b. Sobreexpresados (72h)

Nombre	Fold change	q-value(%)
hsa-miR-142-3p	7360.561	0
hsa-miR-142-5p	2680.151	0
hsa-miR-597	514.189	0
hsa-miR-577	95.612	0
hsa-miR-518a-5p	35.399	0
hsa-miR-767-3p	15.198	0
hsa-miR-508-5p	15.874	0
hsa-miR-769-3p	75.365	0

Infraexpresados (72h)

Nombre	Fold change	q-value(%)
hsa-miR-602	0.0479	0

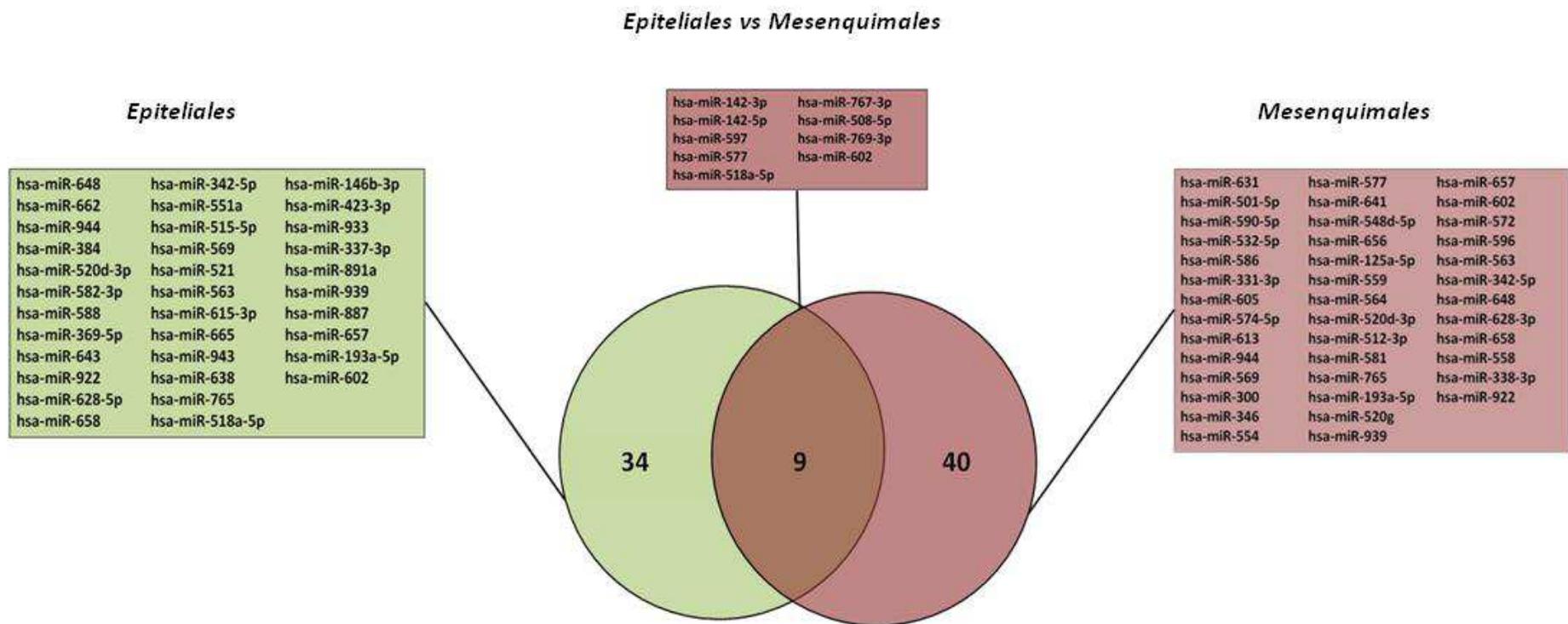


Fig. 38. Resumen de miARN desregulados totales entre 24 y 72 horas de tratamiento con panobinostat®. Se aplico el test estadístico para microarray (SAM) para cada tipo de tumor entre los perfiles de miARNs de 24 y 72 horas de tratamiento. En verde: células epiteliales. Granate: células Mesenquimales. Para la comparación entre los dos tipos de tumores (epiteliales vs mesenquimales) se relaciona la combinación de la comparación a ambos tiempos.

El análisis de las dianas de los miARNs desregulados en respuesta al tratamiento con Panobinostat® en las líneas celulares de origen mesenquimal y epitelial tras realizar un agrupamiento jerárquico de los comunes con el programa *Expander* en los dos tiempos diferentes de tratamiento, mostró que tras 24 horas de incubación podíamos diferenciar claramente miARNs que mostraban una variación específica en las células de estirpe mesenquimal y otros en las células de estirpe epitelial (fig. 39).

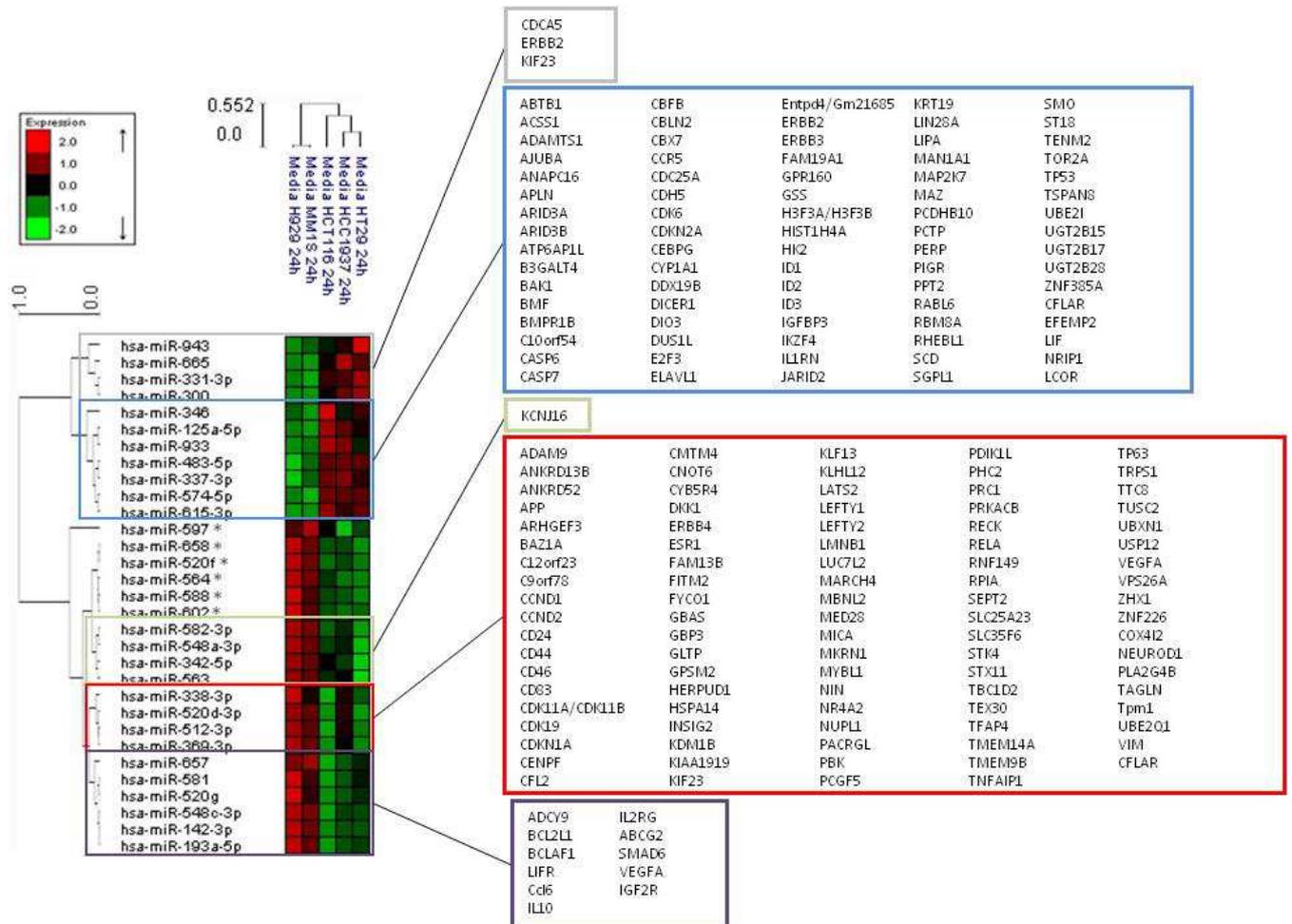


Fig. 39: Representación gráfica de los miARNs cuya expresión varía en respuesta al tratamiento con Panobinostat® durante 24 horas en el que se observa una agrupación bien definida dependiendo del origen celular del tumor. (*) Sin dianas validadas experimentalmente.

El análisis tras 72 horas de incubación mostró resultados similares, ampliándose el número de miARNs (fig. 40).

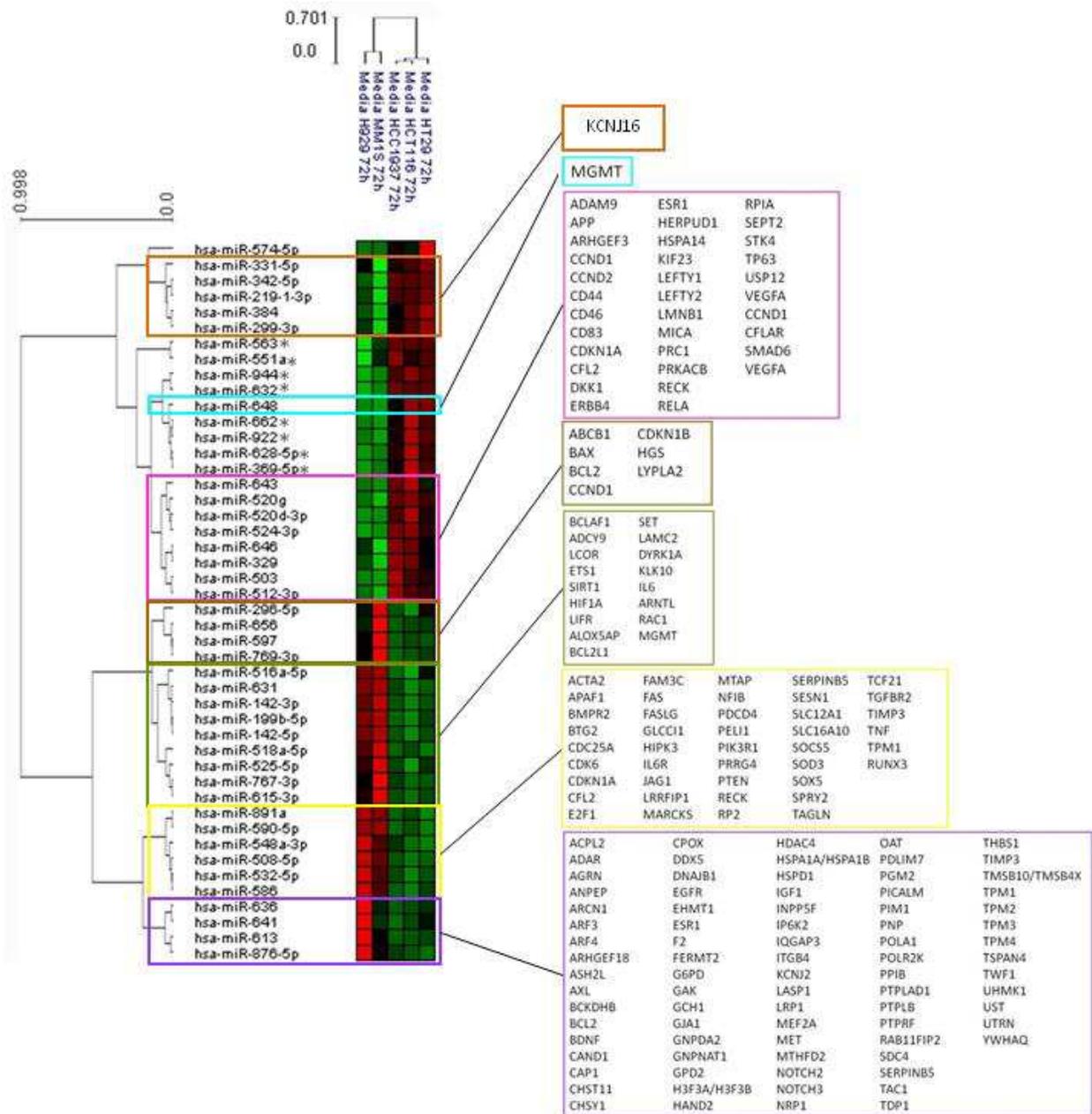


Fig. 40. Representación gráfica de los miARNs cuya expresión varía en respuesta al tratamiento con Panobinostat® durante 72 horas. La asociación de miARNs es más clara que a 24 horas, diferenciándose por un lado el tipo epitelial y por otro el mesenquimal. (*) Sin dianas validadas experimentalmente.

Todos estos resultados muestra una diferente respuesta al Panobinostat® en función del origen celular del tumor.

EFFECTO DE DECITABINA® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA

Un segundo grupo de fármacos que actúan sobre mecanismos epigenéticos son los que modifican la metilación de la citosinas. Entre estos fármacos se encuentra la Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) que, al ser un análogo de las pirimidinas, se introduce durante la síntesis de ADN en la doble cadena reduciendo el nivel de metilación de las citosinas del ADN, con lo que se puede restaurar la expresión de genes como los supresores tumorales o genes inductores de apoptosis, que podrían estar silenciados por una hipermetilación de los promotores.

En nuestro estudio hemos analizado la respuesta a la Decitabina® de las mismas líneas celulares derivadas de cáncer de colon y mama. Inicialmente realizamos un ensayo con concentraciones crecientes del fármaco en la línea celular *HCT116* para determinar las concentraciones mínima y máxima que podíamos utilizar. Como mostramos en la fig. 41 la LC_{50} es de aproximadamente $3\mu M$.

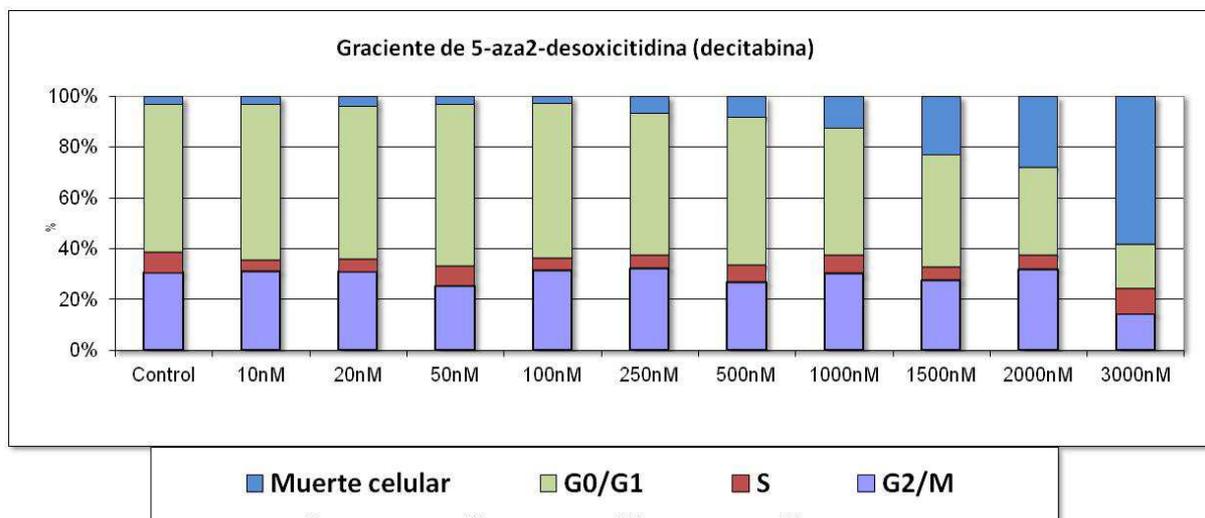


Fig. 41. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo para determinar la concentración óptima del tratamiento Decitabina®. Se analizó la línea HCT116 en presencia del compuesto a distintas concentraciones hasta tener una estimación de la concentración a la que el 50% de las células están muertas (LC_{50}). Esta se determinó en torno a $3\mu M \pm 0,5$.

El análisis de la viabilidad celular mediante MTT en las dos líneas de cáncer de colon tras incubación con Decitabina® hasta 72 horas a las concentraciones $0,5\mu M$, $1\mu M$, $2\mu M$ y $3\mu M$, mostró ausencia de respuesta en ambas líneas celulares (fig. 42).

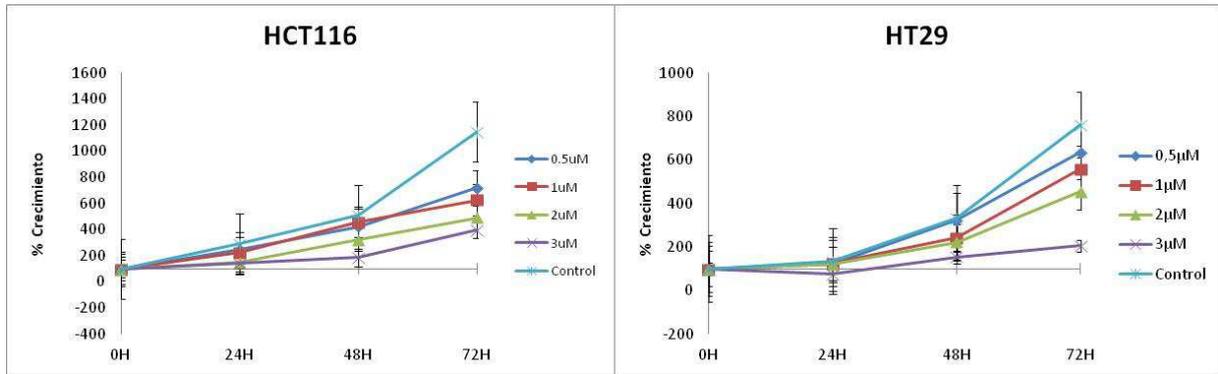


Fig. 42. Análisis de proliferación celular mediante MTT en líneas celulares de cáncer de colon tratadas con Decitabina®. La fig. muestra que a pesar de tener el compuesto, ambas líneas mantienen una proliferación activa a todas las concentraciones, si bien esta es ligeramente menos pronunciada cuanto mayor es la concentración.

El mismo estudio en líneas celulares de cáncer de mama que poseen el gen BRCA1 germinal tampoco evidenció ningún efecto tras incubación con Decitabina® durante las primeras 48 horas aunque a las 72 horas se observa una discreta disminución del crecimiento a concentraciones del fármaco de 3µM principalmente en la línea celular *hs578t* (fig. 43).

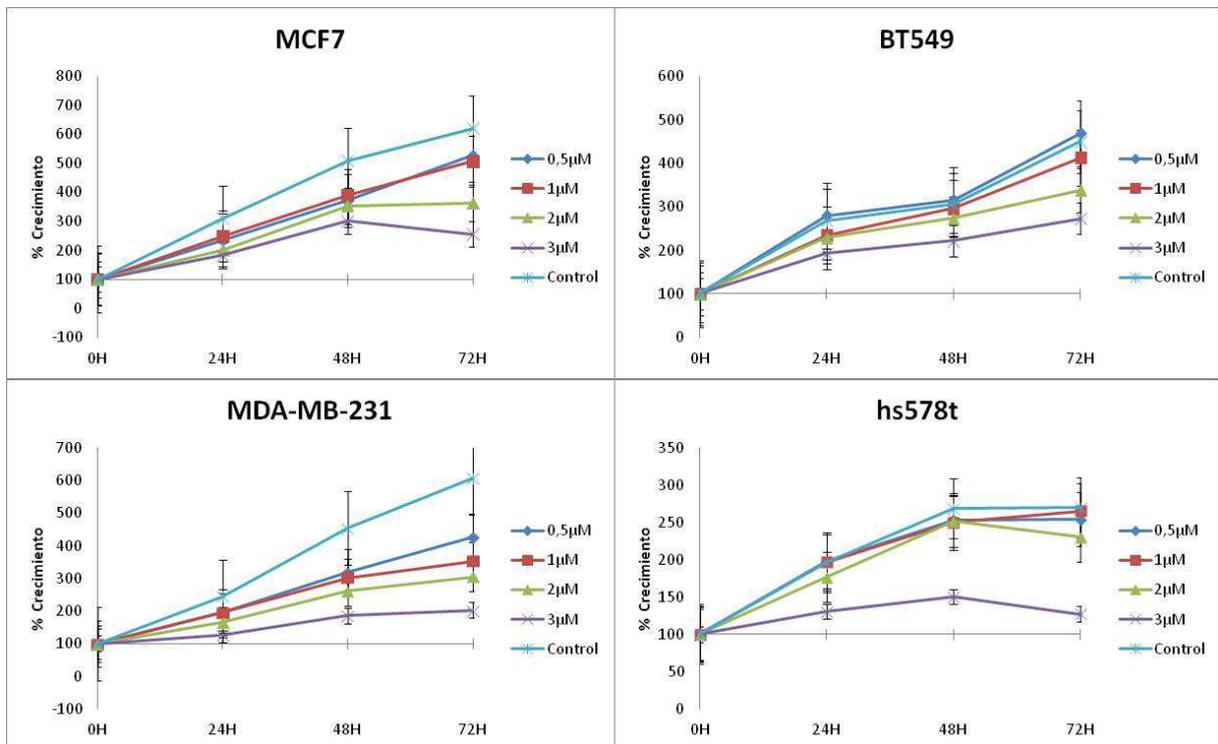


Fig. 43. Análisis de proliferación mediante MTT en líneas celulares de cáncer de mama tratadas con Decitabina®. La fig. muestra que todas las líneas mantienen un crecimiento activo hasta las 48 horas de tratamiento. Las líneas MDA-MB-231 y BT549 mantienen ese crecimiento activo tras 72 horas; sin embargo, *hs578t* y MCF7 sufre una disminución en el número de células metabólicamente activas a las 72 horas con las dos concentraciones más altas.

Al estudiar el efecto de la Decitabina® en líneas celulares portadoras del gen BRCA1 mutado observamos que mientras la línea *Sum149pt* mantiene un crecimiento activo a todas las concentraciones, la línea celular *HCC1937* disminuye su crecimiento a concentraciones del fármaco superiores a 2µM (fig. 44):

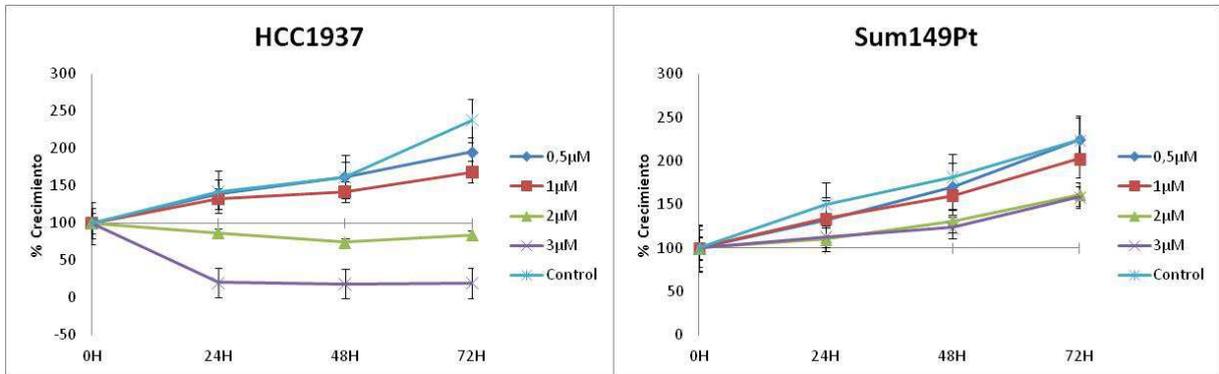
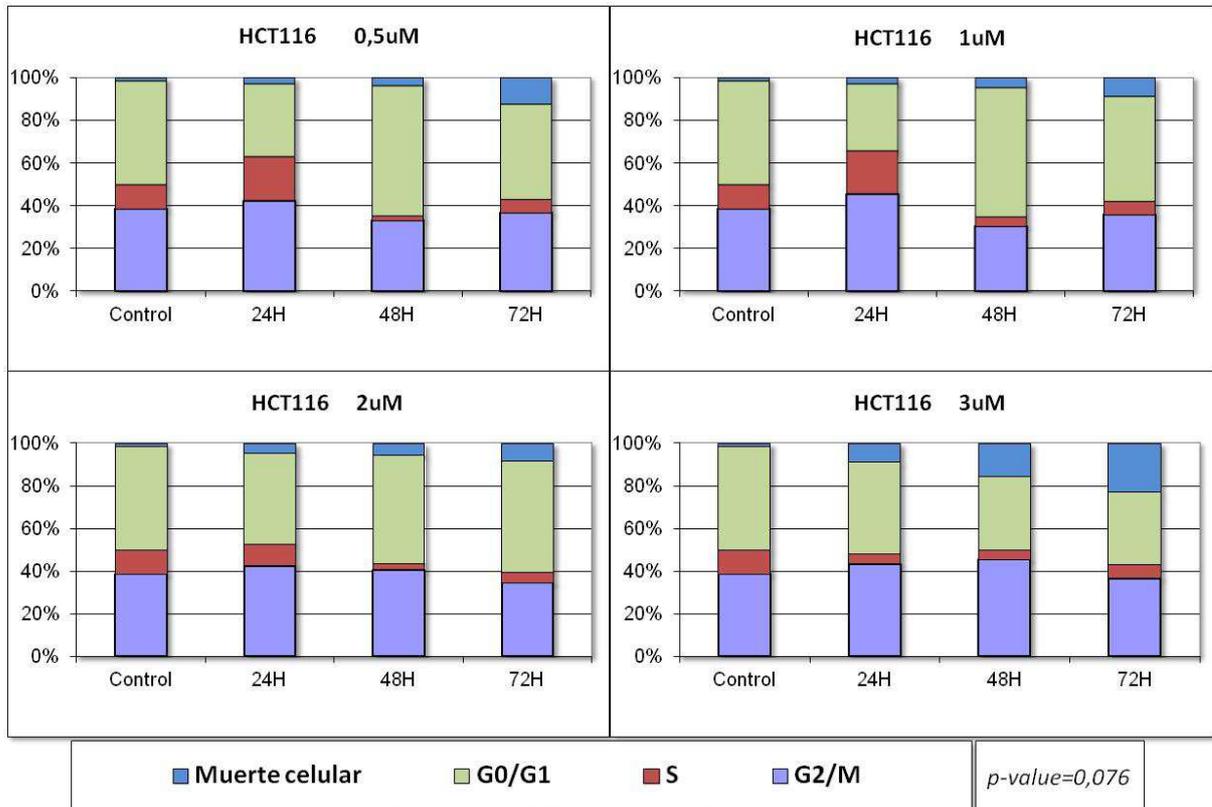


Fig. 44. Análisis de proliferación mediante MTT en líneas celulares de cáncer de mama. En la fig. se observa que a pesar de tener el compuesto, la línea *Sum149pt* mantiene crecimiento activo a todas las concentraciones al igual que *HCC1937* a las dos concentraciones más bajas. Sin embargo esto no se observa con las concentraciones altas en *HCC1937* viendo una clara inhibición del crecimiento celular.

El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo mostró, en el caso de las líneas celulares derivadas de cáncer de colon, una muy discreta modificación del ciclo celular con un ligero aumento de mortalidad a 3µM, lo que se correlaciona con los resultados de supervivencia celular (fig. 45):



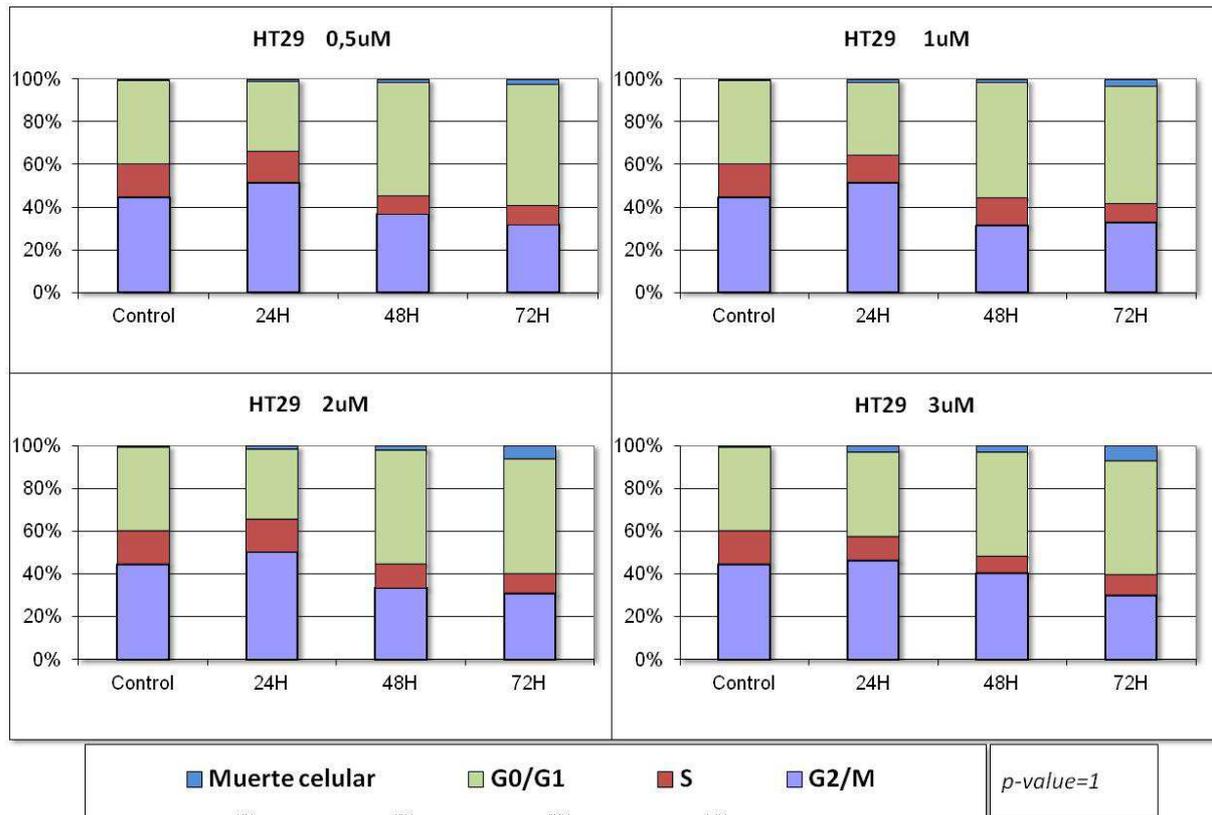


Fig. 45. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de colon tratadas con Decitabina®. La mortalidad celular (en color azul) no aumenta significativamente con el tratamiento en ninguna de las dos líneas. Además, las distintas fases del ciclo celular también se mantienen normales a lo largo de las horas. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

El análisis del ciclo celular tras incubación con Decitabina® en las líneas derivadas de cáncer de mama mostró que la línea *MCF7* (triple positiva y con el gen *BRCA1* germinal) presenta una mortalidad ligeramente más alta a 3 μM que las líneas de colon antes estudiadas (fig. 46).

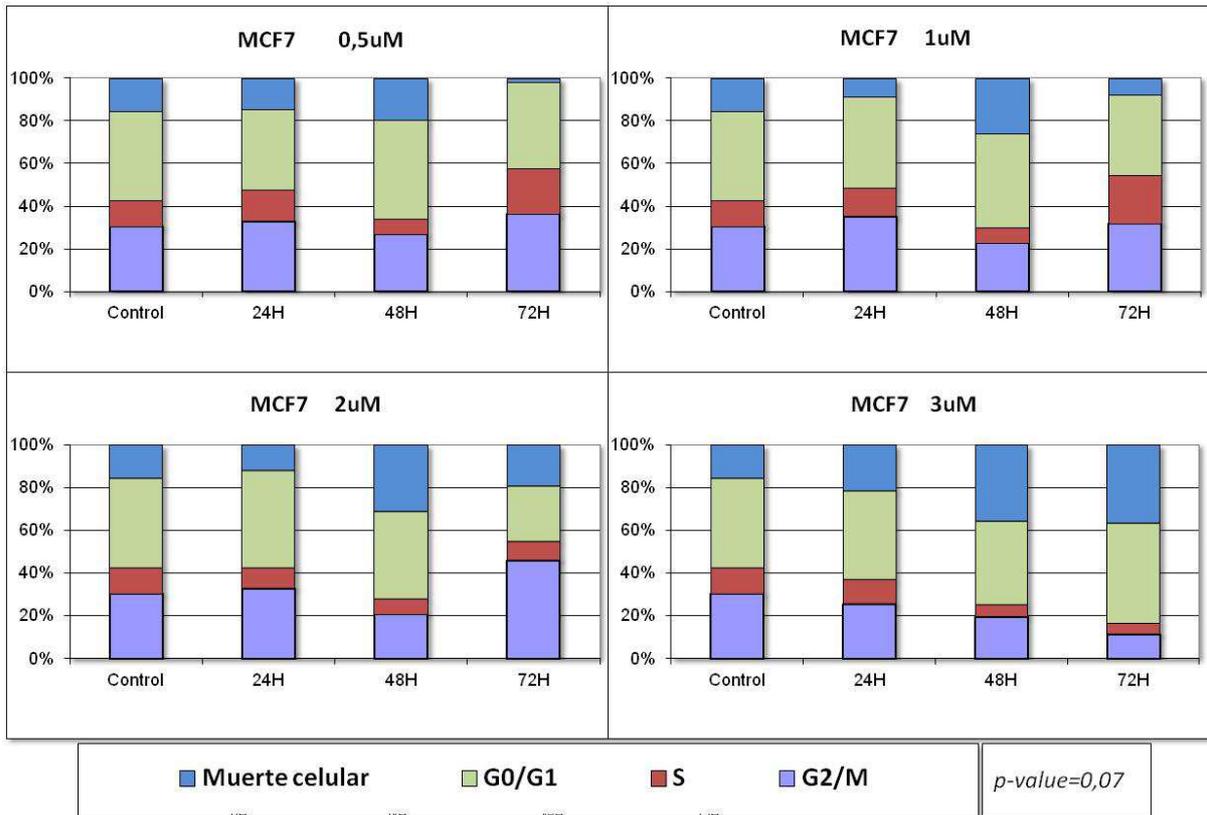
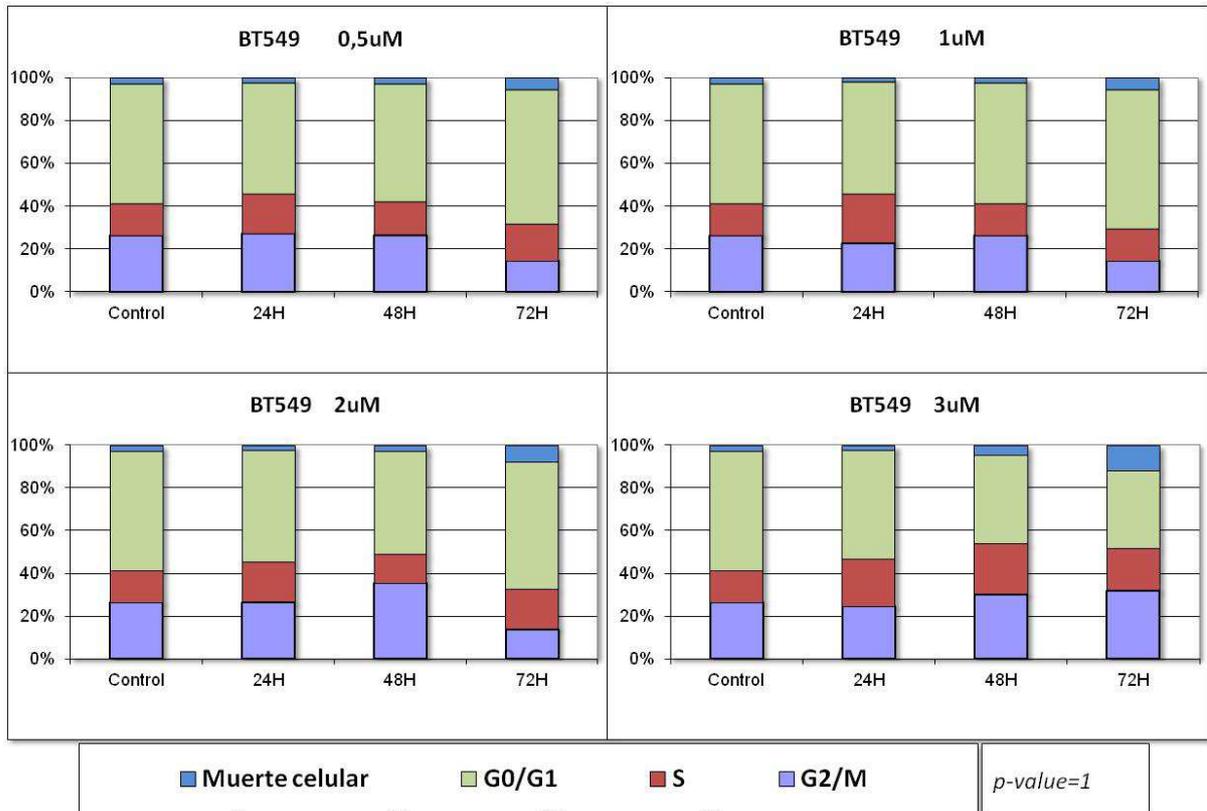


Fig. 46. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en la línea celular de cáncer de mama MCF7. En este caso la mortalidad es ligeramente mayor que en las líneas de cáncer de colon, aunque sin llegar a niveles importantes. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

Resultados similares obtuvimos al estudiar líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativos con BRCA1 germinal (fig. 47).



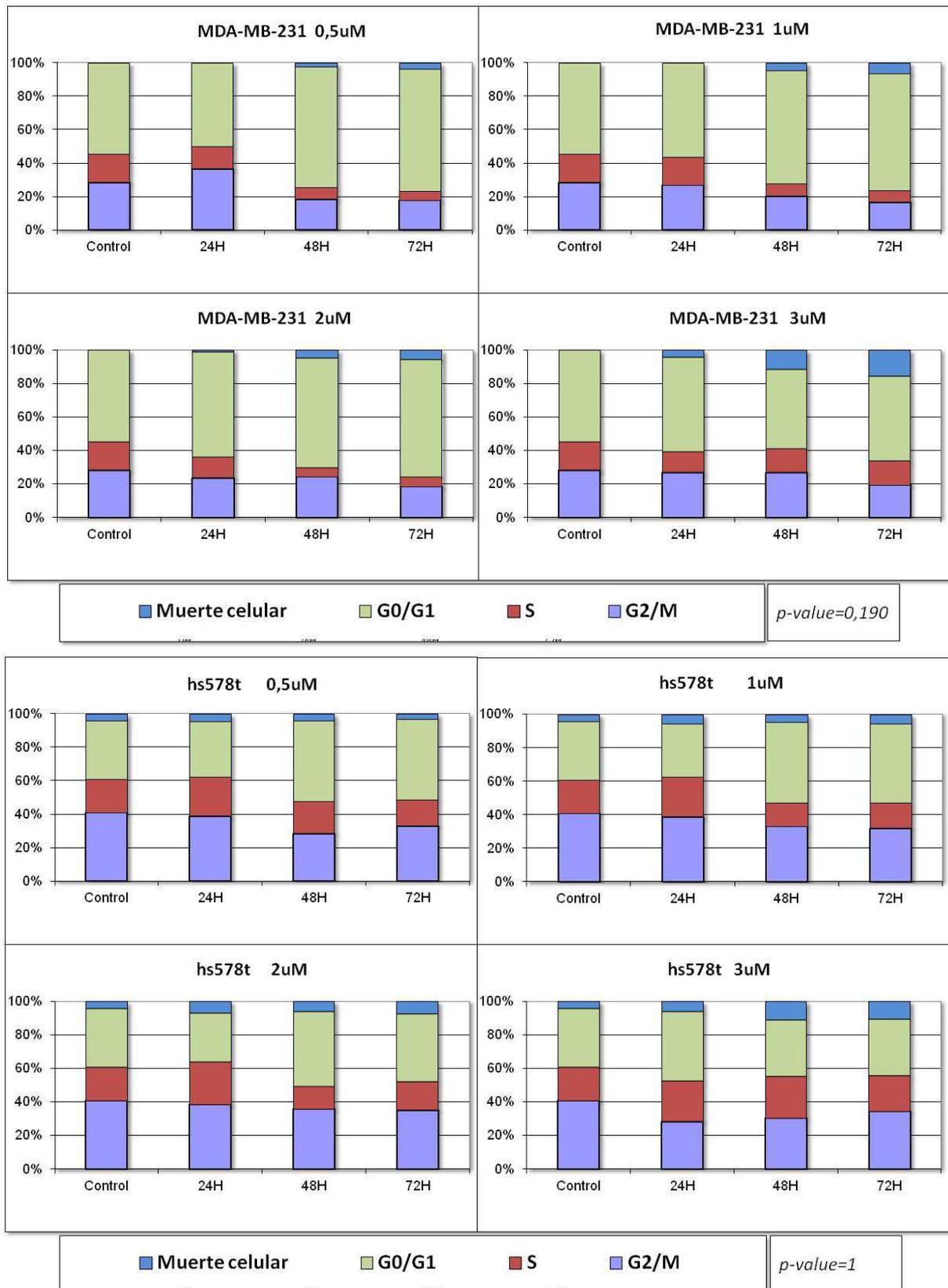
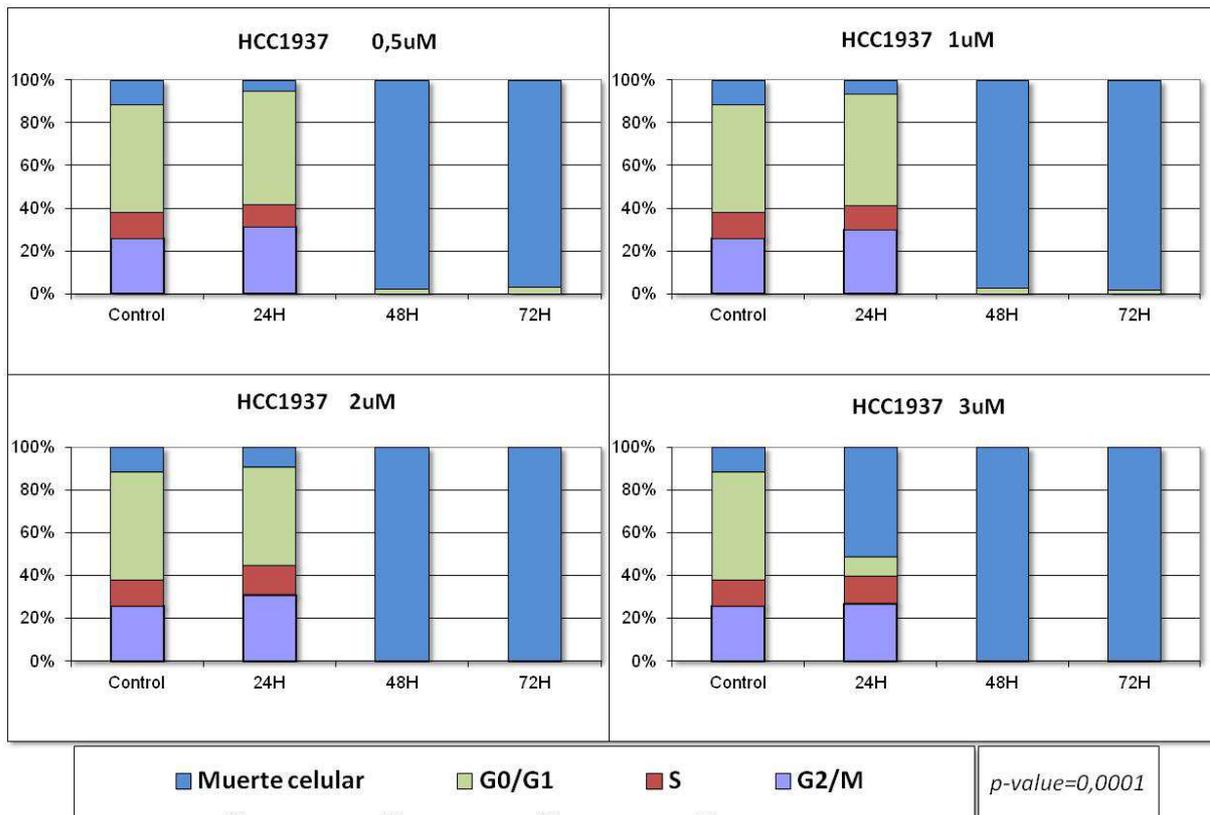


Fig. 47. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de mama que no presentan mutación en BRCA1 y son triple negativas. Ninguna de las tres líneas celulares parece tener ningún tipo de respuesta a tratamiento con Decitabina®. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

Por último, estudiamos el ciclo celular tras la incubación con Decitabina® de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativas portadoras del gen BRCA1 mutado, observando una elevada mortalidad en la línea *HCC1937*, de manera similar a lo observado en los estudios de supervivencia. En el caso de la línea *Sum149pt*, observamos también un incremento de la mortalidad a partir de las 48 horas aunque no tan acusado como en *HCC1937* en el que la mortalidad es casi del 100% a las 72 horas (fig. 48).



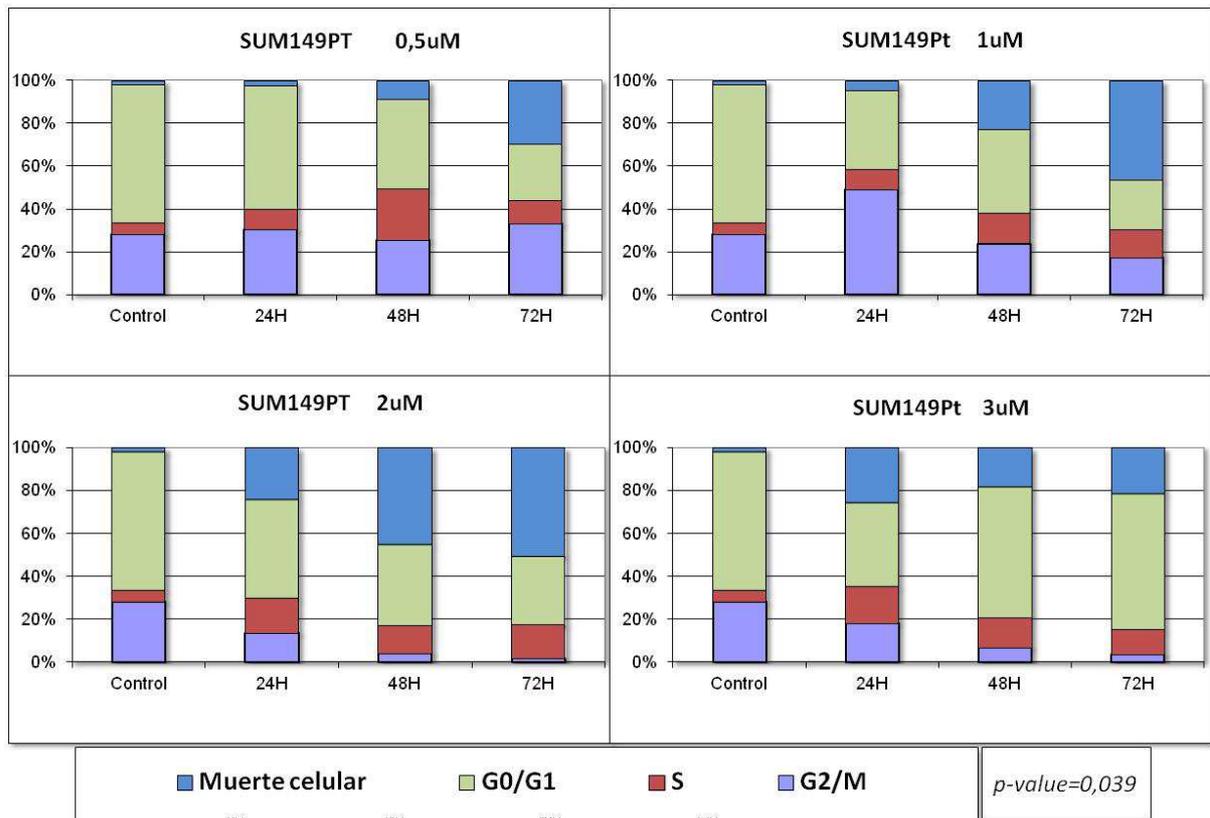


Fig. 48. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en líneas celulares de cáncer de mama que presentan mutación en BRCA1. Se observa como en ambas líneas la mortalidad se incrementa considerablemente cuando aumentamos el tiempo de exposición al fármaco y la concentración. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE PANOBINOSTAT® Y DECITABINA® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA

Es bien conocido que la quimioterapia combinada suele ser más efectiva que la monoterapia para el tratamiento de la mayoría de los tumores. Actualmente una parte de la investigación en epigenética del cáncer se está centrando en probar diversas combinaciones de fármacos reguladores de la actividad epigenética y, en este punto, el uso de dos inhibidores de procesos tan importantes como la acetilación y la metilación podría tener un efecto positivo en el tratamiento del cáncer. En este trabajo ya hemos analizado el efecto de la incubación con Panobinostat® y Decitabina® sobre líneas celulares derivadas de cáncer de colon y mama. Analizaremos ahora la respuesta a la combinación de ambos compuestos.

Inicialmente realizamos un análisis de las estructuras químicas para descartar la posibilidad de que ambas moléculas pudiesen reaccionar entre sí dado que las estructuras químicas de ambos compuestos presentan varios grupos susceptibles de sufrir un ataque nucleofílico por parte de la otra molécula, lo que podría generar un tercer compuesto.

En un análisis de espectrometría de masas llevado a cabo en el laboratorio de química orgánica de la Universidad de Salamanca, a la concentración máxima utilizada de cada uno de los compuestos (150nM para Panobinostat® y 3µM para Decitabina®) y de la mezcla de ambos en condiciones similares a las de un cultivo celular mostró la ausencia de aductos consecuencia de la reacción entre ambos compuestos (fig. 49). Marcado con una flecha, vemos el tamaño de la Decitabina® en el espectro de masas el cual no desaparece a lo largo del tiempo (fig. 50).

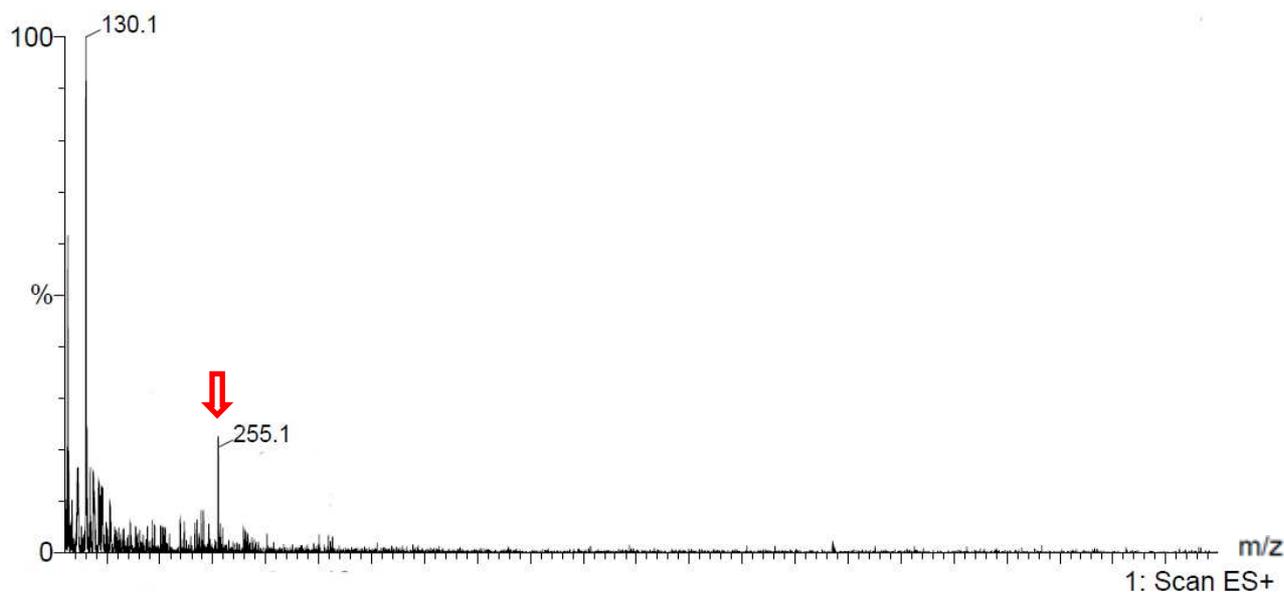


Fig. 49. Espectro de masas de la Decitabina® únicamente. La flecha señala el tamaño que tiene en la relación masa-carga.

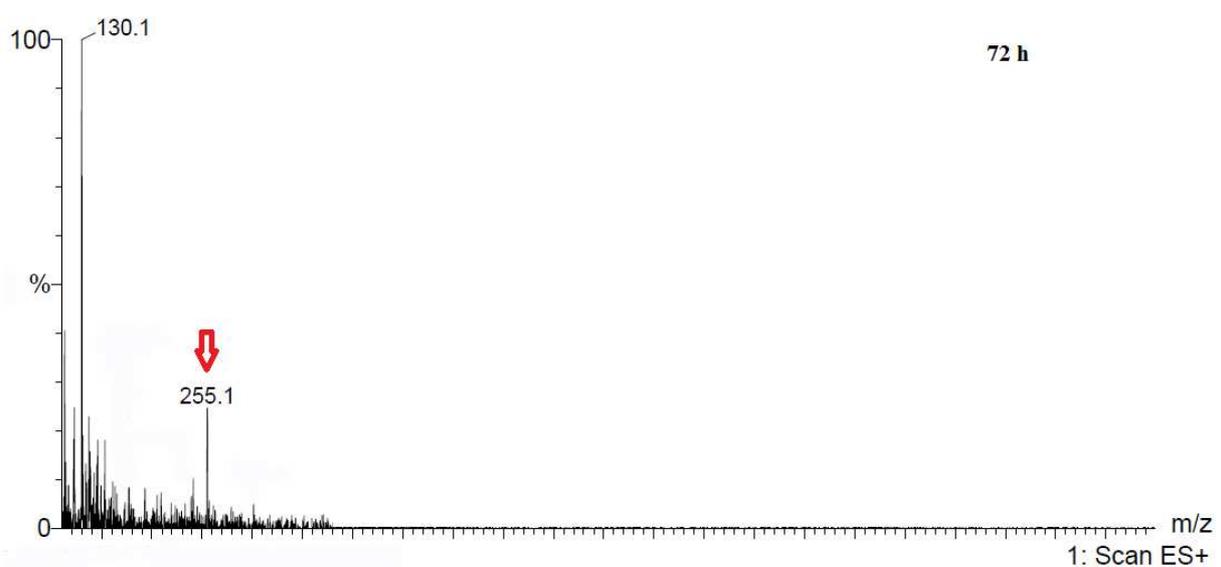
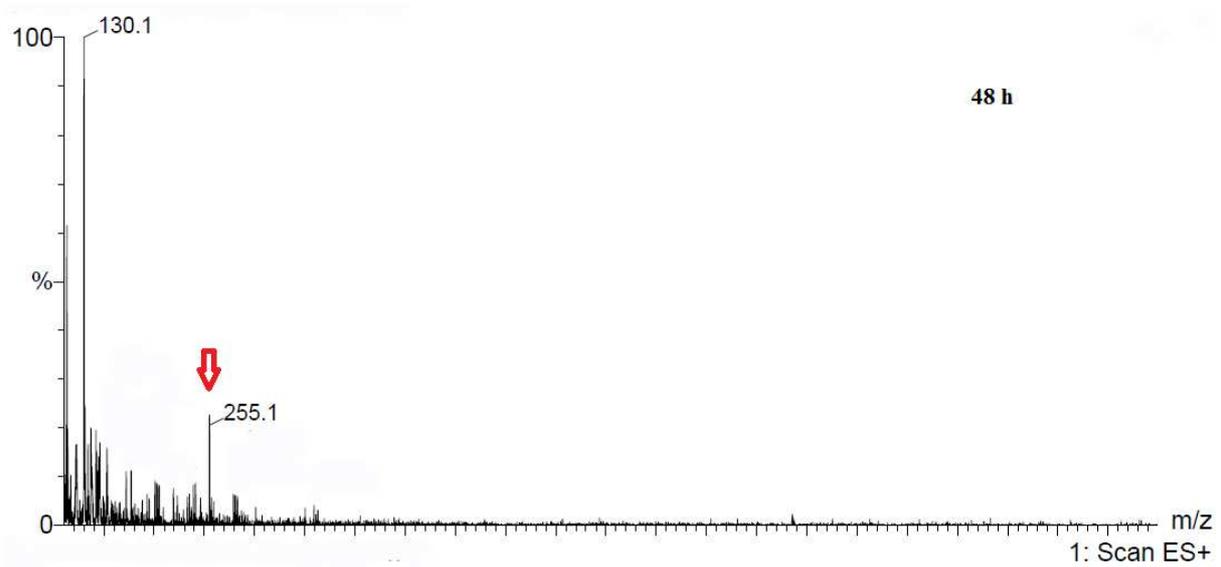
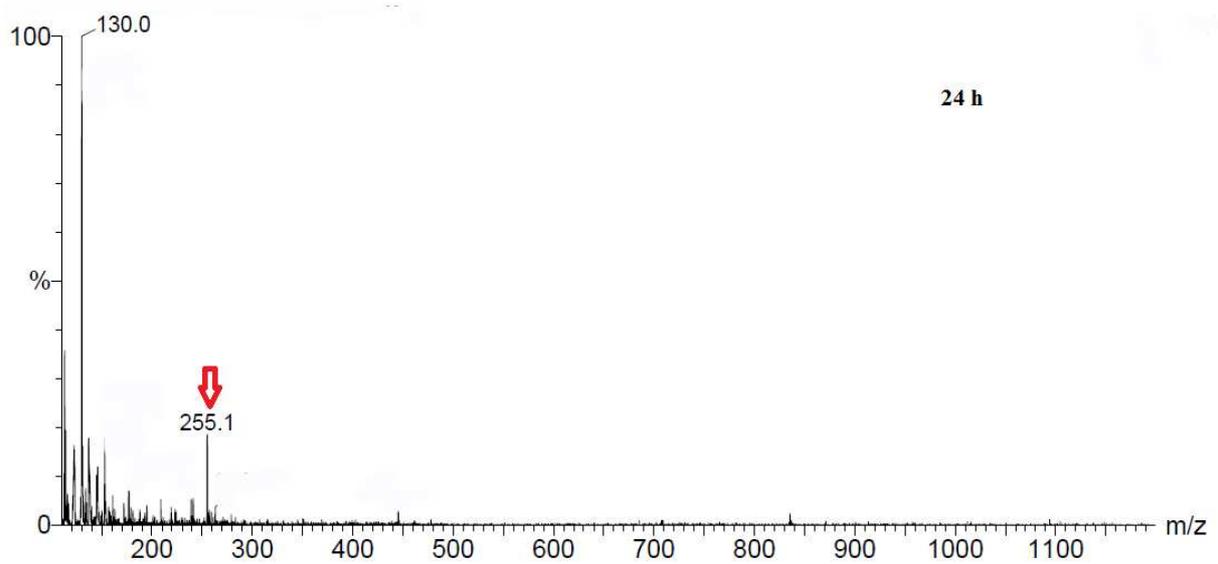


Fig. 50. Espectro de masas con la mezcla de ambos fármacos. Tras 72 horas se observa siempre que el pico señalado, que corresponde con el de la Decitabina® es constante y no aparece, a relaciones masa/carga superiores, ninguna otra señal como resultado de la aparición de un tercer compuesto fruto de la reactividad de los dos anteriores.

Tras la incubación de las dos líneas de cáncer de colon con la mezcla de los dos compuestos, 50nM + 0,5µM, 75nM + 1µM, 100nM + 2µM y 150nM + 3µM de Panobinostat® y Decitabina® respectivamente, observamos que en la línea *HT29* mantiene la capacidad proliferativa tras 72 horas en cultivo con las dos concentraciones de fármaco más bajas aunque hay una inhibición al incubar con las dos concentraciones más altas de los fármacos. Sin embargo, La línea *HCT116* presenta inhibición del crecimiento tras las primeras 24 horas, más acusado con el paso del tiempo e independiente de la concentración del fármaco (fig. 51).

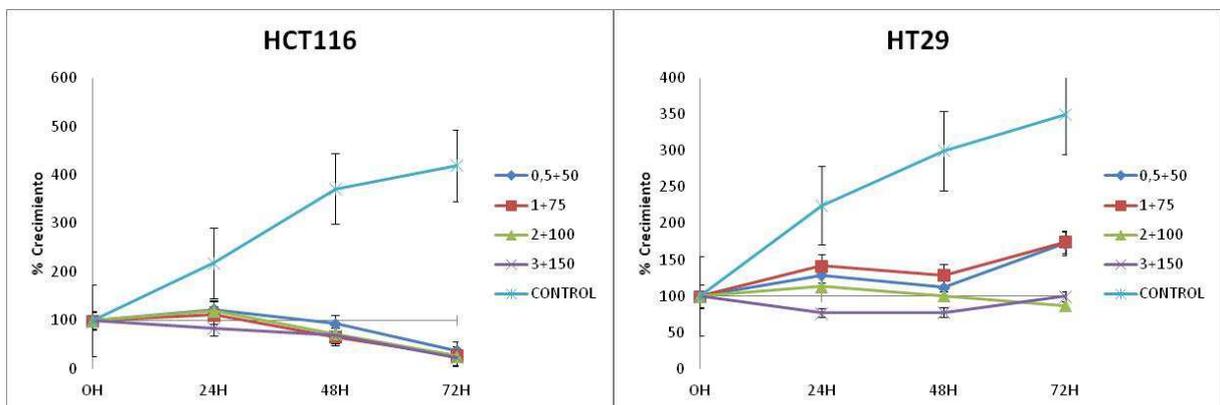
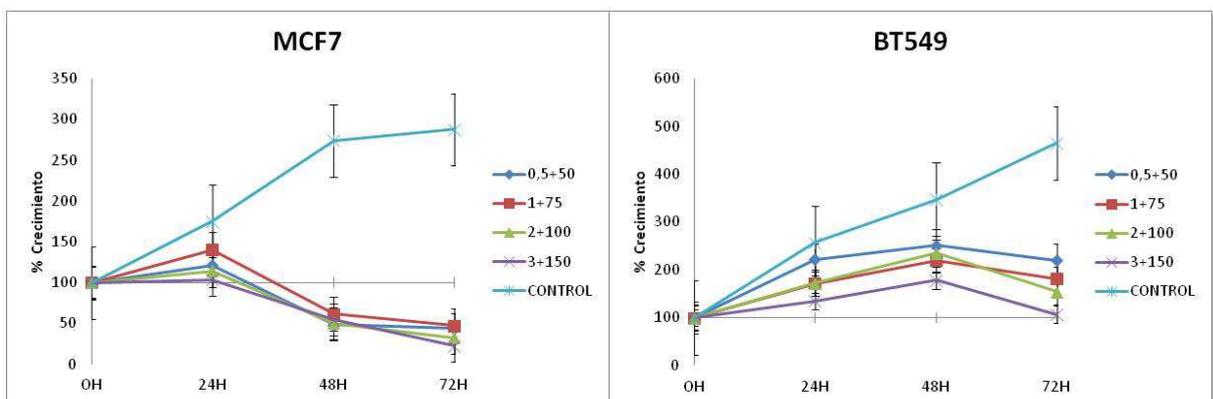


Fig. 51. Análisis de proliferación mediante MTT en las líneas celulares de cáncer de colon. El tratamiento con ambos compuestos tiene un efecto diferente en ambas líneas. En *HCT116* inhibe el crecimiento desde las primeras 24 horas, sin embargo en *HT29* se mantiene la proliferación con las dos combinaciones de fármacos menos concentradas. Con las más concentradas, la inhibición está patente.

El estudio de la respuesta de las líneas de cáncer de mama triple negativas portadoras de BRCA1 germinal mostró que las líneas celulares *MCF7*, *MDA-MB-231* y *hs578t* presentan un comportamiento muy similar entre ellas observando una disminución de su crecimiento que se incrementa con el paso del tiempo (fig. 52).



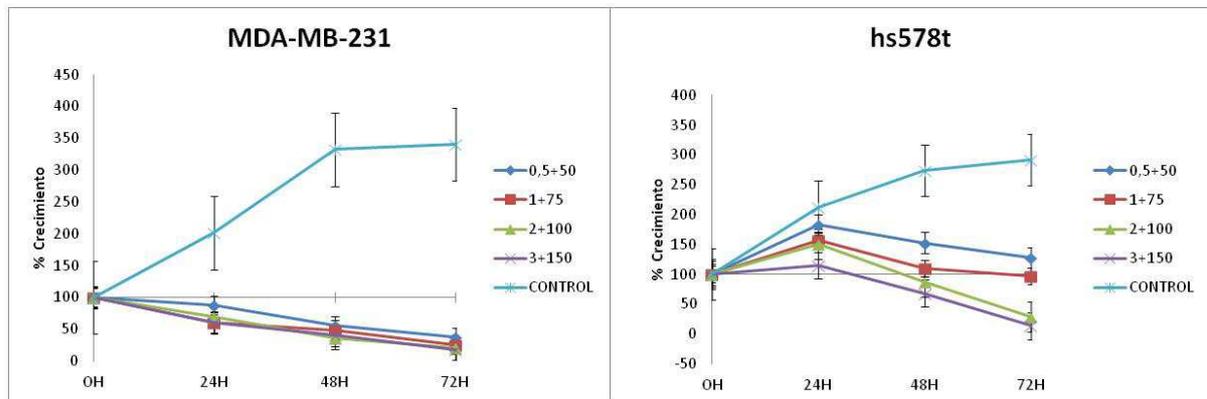


Fig. 52. Análisis de proliferación mediante MTT en líneas celulares de cáncer de mama sin mutación en BRCA1. Todas las líneas parecen tener un comportamiento similar al tratamiento con ambos compuestos. La línea BT549 parece ser ligeramente más resistente que las otras tres pues hasta 48 horas mantiene su capacidad proliferativa.

La incubación con Panobinostat® y Decitabina® de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativas portadoras del gen BRCA1 mutado *HCC1937* y *Sum149pt* mostró una inhibición de crecimiento a las 24 horas de cultivo con las concentraciones más altas, más acusado en esta última línea celular (fig. 53).

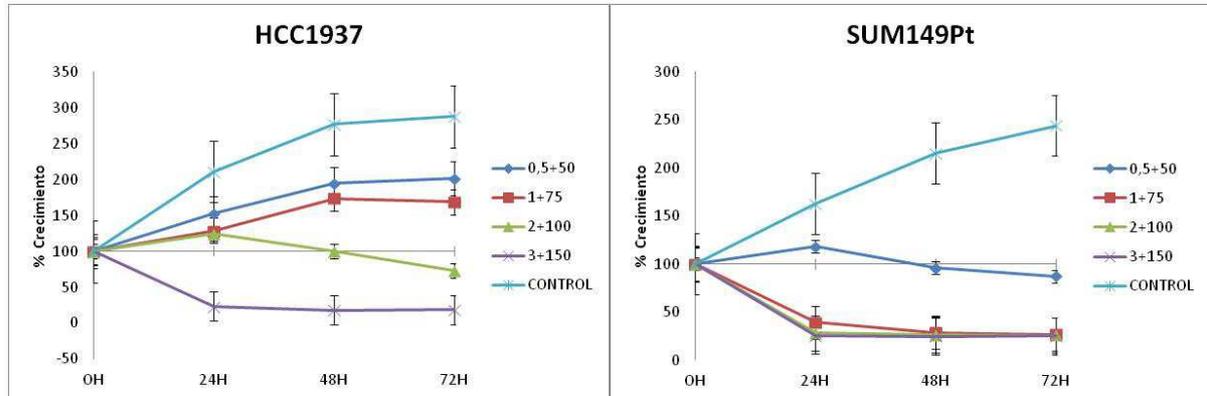


Fig. 53. Análisis de proliferación mediante MTT en líneas celulares de cáncer de mama con mutación en BRCA1. Ambas líneas presentan inhibición del crecimiento con las concentraciones más altas tras 72 horas en cultivo. HCC1937 parece ser más resistente a concentraciones bajas de los compuestos que Sum149pt.

El estudio mediante citometría de flujo del efecto sobre el ciclo celular de la incubación con Panobinostat® y Decitabina® en las líneas celulares de cáncer de colon mostró un aumento de la mortalidad cuanto mayor es el tiempo de exposición en las 4 concentraciones empleadas (fig. 54):

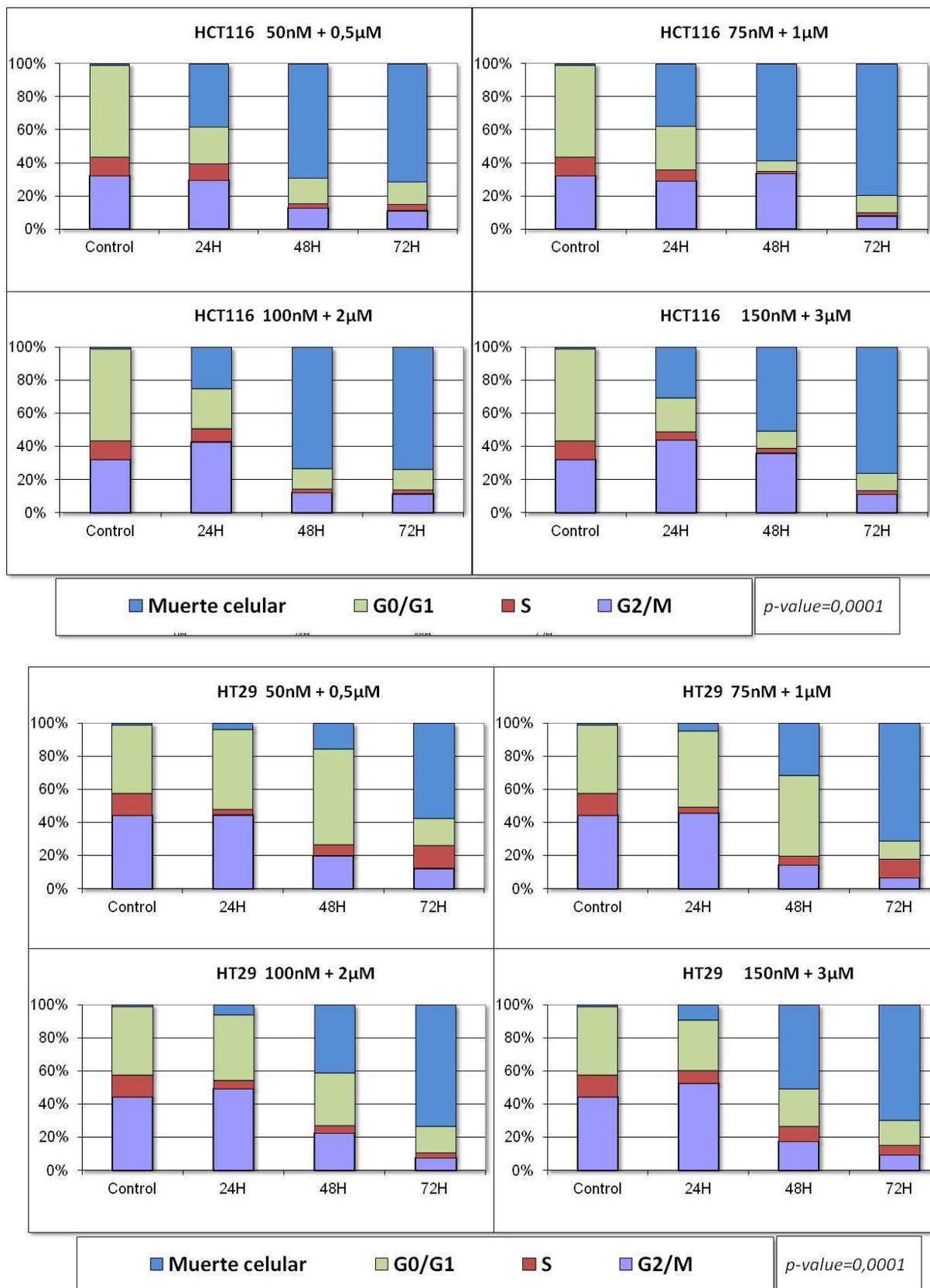


Fig. 54. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de colon incluidas en nuestro trabajo. En este caso ambas líneas presentan una clara sensibilidad al tratamiento aunque ligeramente menos acusada que solo con Panobinostat. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

El estudio del ciclo celular en la línea de cáncer de mama *MCF7* (triple positiva y con BRCA1 germinal) mostro un claro incremento de la mortalidad tras 72 horas en cultivo a cualquiera de las concentraciones (fig. 55).

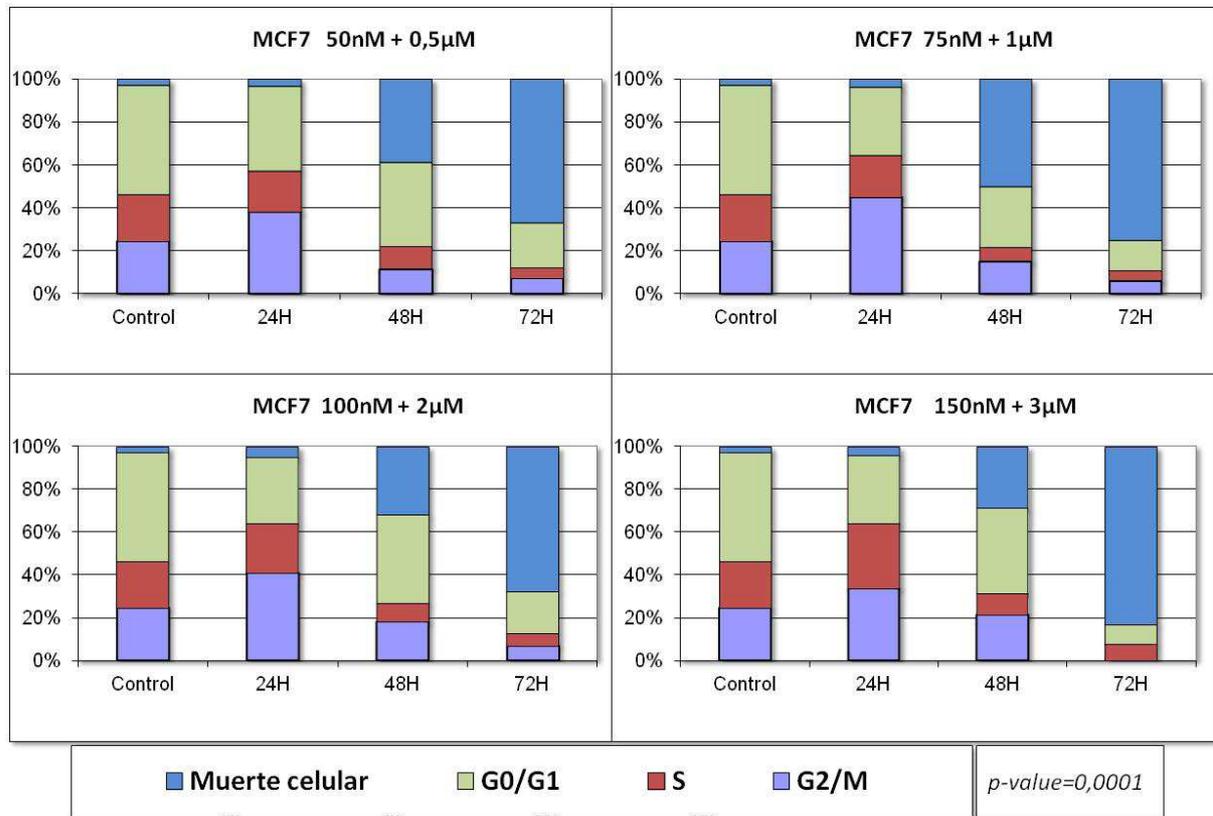
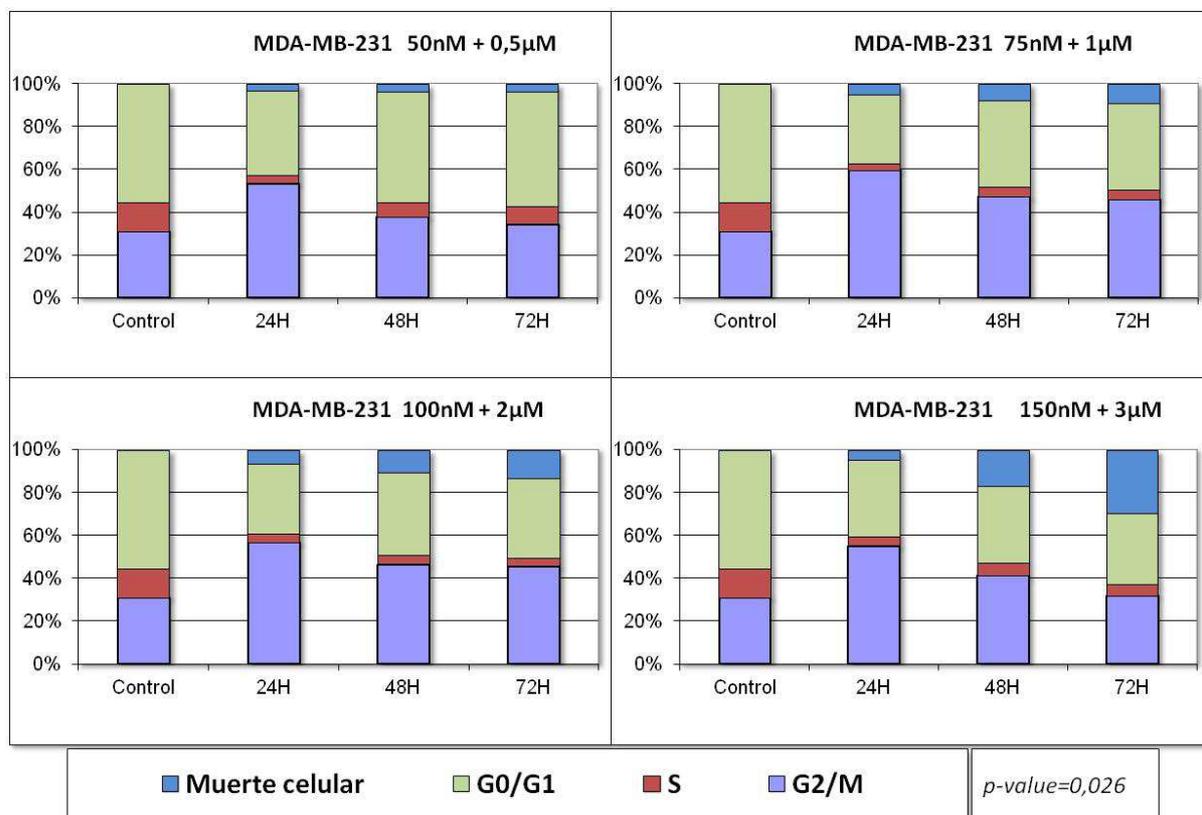
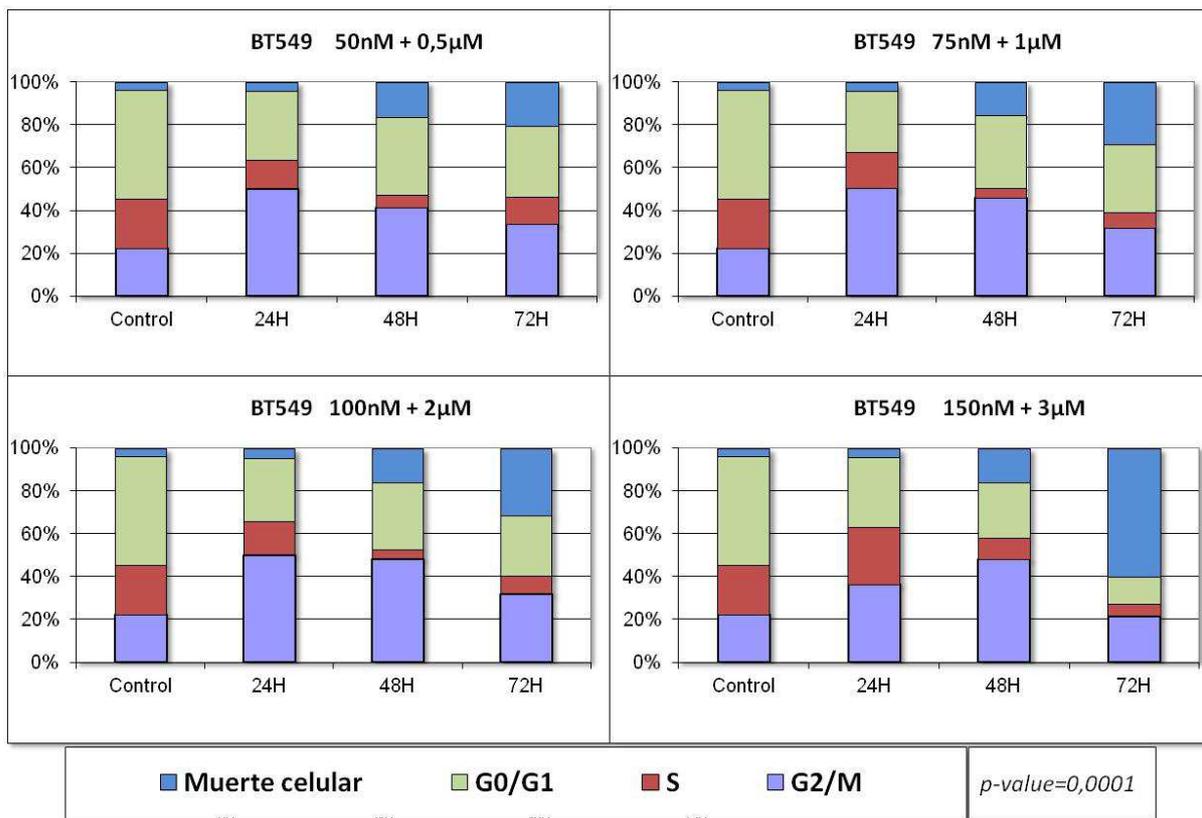


Fig. 55. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en la celular de cáncer de mama *MCF7*. Se observa un claro incremento de la mortalidad celular tras 72 horas en cultivo con los compuestos a todas las concentraciones estudiadas. El *p-value* hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

El estudio de las líneas triples negativas con BRCA1 germinal mostró un ligero incremento de la mortalidad celular tras 72 horas en cultivo con todas las concentraciones excepto la línea celular *BT549* que mostró una elevada mortalidad a las 72 horas con las concentraciones más elevadas (fig. 56).



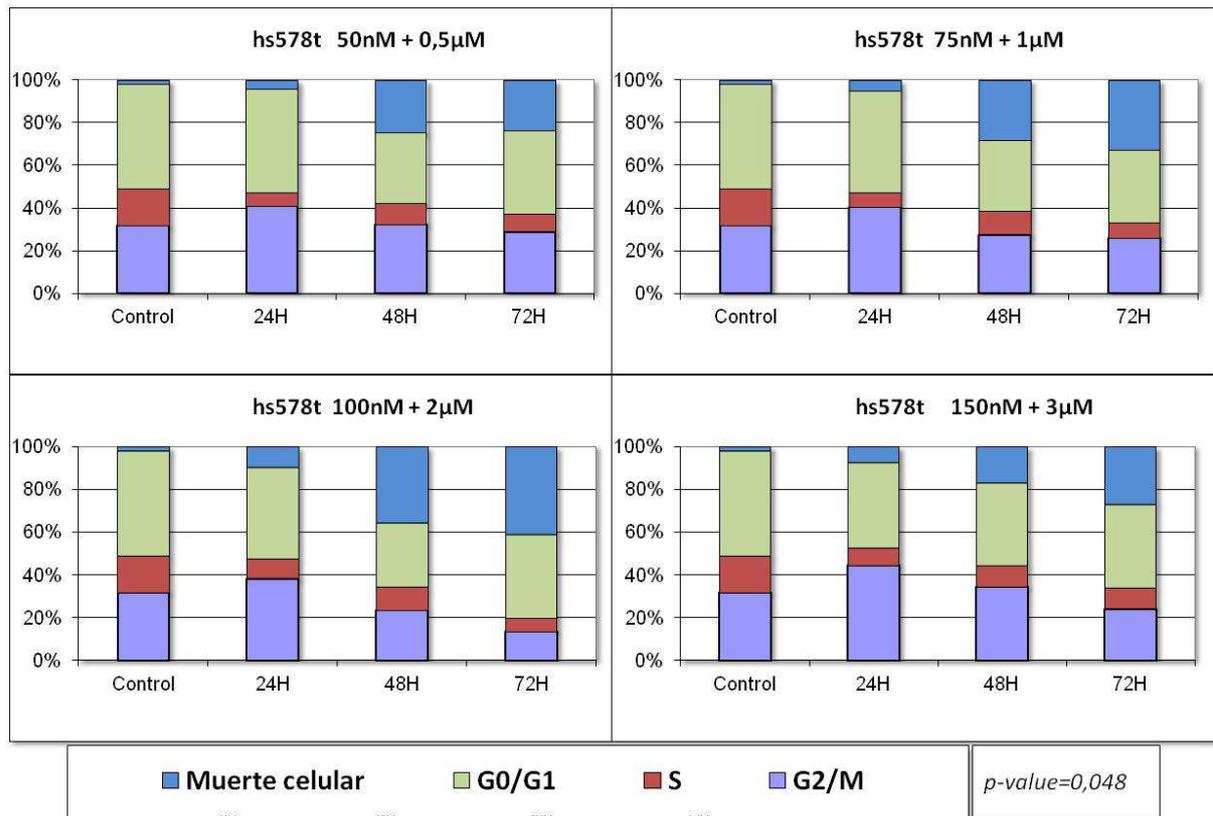


Fig. 56. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de mama que no son portadoras de mutación en BRCA1. Se observa que las tres líneas celulares muestran un ligero incremento de la mortalidad celular tras 72 horas en cultivo. Este es mayor en la línea BT549 tras 72 horas en cultivo con la concentración mayor de todas. El *p*-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

Por último, analizamos el efecto de la incubación con Panobinostat® y Decitabina® sobre líneas de cáncer de mama triple negativas portadoras del gen BRCA1 mutado. Como mostramos en la fig. 57, la línea *HCC1937* presenta una elevada mortalidad a las 72h de incubación con las concentraciones más elevadas. Sin embargo, la línea celular *Sum149pt* incrementa su mortalidad a partir de las 48 horas con la concentración de 75nM + 1µM y alcanza el 100% a las 24h tras incubación a las concentraciones más levadas (fig. 57).

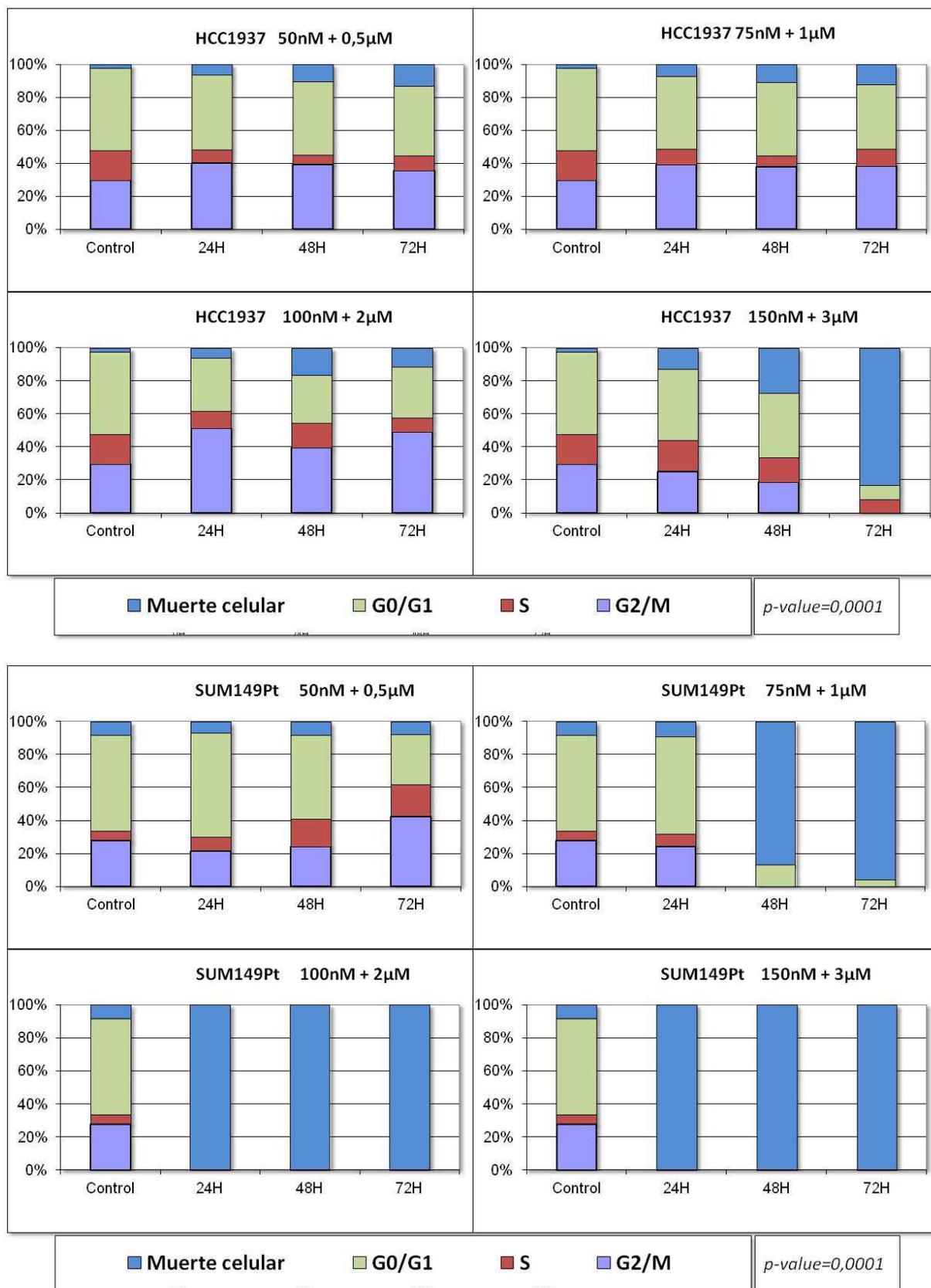


Fig. 57. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de mama portadoras de mutación en BRCA1. La línea HCC1937 muestra una resistencia al tratamiento a las tres concentraciones más bajas y solo a la mayor se observa una respuesta; sin embargo, Sum149pt presenta mortalidad a partir de 48 horas. Las concentraciones superiores son letales desde las primeras 24h. El p-value hace referencia a la asociación de la mortalidad con el tratamiento.

En resumen, nuestro trabajo muestra que la combinación de Decitabina® y Panobinostat®, revierte la respuesta de las líneas celulares resistentes al tratamiento con Panobinostat® aislado.

Discusión

DISCUSIÓN

Los cambios epigenéticos desempeñan un papel esencial en el control de la proliferación, la inducción de muerte celular y, en general, en todos los procesos celulares. Muchos estudios ya han demostrado que si se alteran los patrones epigenéticos, se producen graves consecuencias en la célula que pueden llevar al desarrollo de numerosas enfermedades, entre ellas el cáncer. Las dos modificaciones epigenéticas más importantes son la metilación de las citosinas del ADN y los cambios postraduccionales de las cadenas laterales de las histonas tales como la acetilación, la fosforilación y la metilación^{62,143-149}

El carácter reversible de los cambios epigenéticos ha abierto la posibilidad de desarrollar una "terapia epigenética" como una opción de tratamiento, especialmente en el caso del cáncer. El objetivo de esta terapia sería revertir los patrones epigenéticos aberrantes que se asocian con la transformación tumoral, induciendo la restauración de un "epigenoma normal"; con esta premisa, se han desarrollado fármacos que pueden revertir eficazmente los patrones epigenéticos, tanto la metilación de las citosinas del ADN, como las modificaciones de las cadenas laterales de las histonas¹⁵⁰.

La acetilación de las lisinas de las cadenas laterales de las histonas inducen una relajación de la conformación de la cromatina que permite la accesibilidad de los factores de transcripción a las regiones promotoras de los genes y su consiguiente activación; por el contrario, la desacetilación de las lisinas, como consecuencia de la actuación de las HDAC, induce una conformación cerrada de la cromatina y el silenciamiento de la expresión génica. Durante el desarrollo tumoral se ha descrito una desregulación de las HDAC que modifican la expresión génica facilitando la supervivencia celular. En este contexto, se han desarrollado inhibidores de las HDAC, habiendo sido aprobados por la FDA el Vorinostat® y la Romidepsina para el tratamiento de los linfomas cutáneos T¹⁵¹. El Panobinostat® es un inhibidor pan-desacetilasa (pan-DACi) que ejerce su actividad principalmente en las HDAC clase I, II y IV⁸³. Estudios preclínicos han demostrado la actividad antitumoral del Panobinostat® en neoplasias hematológicas como la leucemia mieloide aguda, la leucemia mieloide crónica, el linfoma de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin y el mieloma múltiple y se

está evaluando su actividad en tumores sólidos¹⁵². En nuestro trabajo hemos profundizado en el estudio de Panobinostat® en tumores sólidos.

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE PANOBINOSTAT® SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA

En nuestro trabajo hemos incluido dos líneas celulares de cáncer de colon: *HTC116*, que es portadora de una mutación en el gen *MLH1*, y *HT29*, portadora de mutación en el gen *p53*; ambas mutaciones fueron confirmadas antes de iniciar el estudio. En el caso de las seis líneas celulares derivadas de cáncer de mama, cinco, *hs578t*, *MDA-MB-231*, *BT549*, *Sum149pt* y *HCC1937*, no expresaban *ERB2* ni los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), por lo que fueron consideradas Triple Negativas (TN); todas ellas eran portadoras de mutación en el gen *p53*; en el caso de *Sum149pt* y *HCC1937* presentaban, además de mutación en *p53*, mutación en el gen *BRCA1*. La línea celular *MCF7*, expresaba los receptores de estrógeno y progesterona y no era portadora de mutaciones ni en *p53* ni en *BRCA1*. En todos los casos confirmamos la presencia o ausencia de las mutaciones en los genes previamente descritos como características de estas líneas celulares con el fin de confirmar que estábamos utilizando las líneas celulares correctas.

Una de las consecuencias de la ausencia actividad de proteínas reparadoras del ADN es la inestabilidad de secuencias microsatélites (MSI)¹⁵³. En ocasiones la ADN-polimerasa comete errores al incorporar nuevas bases nitrogenadas a la hebra de ADN durante la replicación de largas regiones repetitivas como las secuencias microsatélites. El desplazamiento por incorporación de una base adicional durante la replicación de una secuencia repetitiva crea un bucle temporal de inserción-delección (IDL) que es reconocido y reparado por el sistema de MMR (*mismatch repair*) del que forma parte la proteína *MLH1*. Si este error no se repara, durante la segunda ronda de replicación, la hebra parental original se copia correctamente, pero la “hija” se sintetiza erróneamente (puesto que tiene el desajuste o IDL) conteniendo la mutación. Ciertos errores individuales en la secuencia de bases nitrogenadas dan como resultado mutaciones puntuales, mientras que los errores causados por IDLs generan desplazamientos de la fase de lectura que se transforman en mutaciones sin sentido (*nonsense*) aguas abajo en la cadena, lo que, en la mayor parte de los

casos, da lugar a una proteína truncada y no funcional. El análisis de inestabilidad de microsatélites confirmó que la línea celular de cáncer de colon portadora de mutación en el gen *MLH1*, *HCT116*, presentaba inestabilidad en los satélites D5S346, 2S123 y D17S250, aunque no en BAT25 y BAT26, que suelen ser inestables en células tumorales derivadas de síndrome de Lynch, aunque se han descrito tumores que carecen de inestabilidad en estos microsatélites a pesar de presentar mutaciones en los genes del sistema MMR^{153,154}.

En el caso de las líneas derivadas de cáncer de mama, encontramos inestabilidad en las dos líneas celulares portadoras de mutación en *BRCA1*. En el caso de la línea celular *HCC1937*, que presenta una mutación en el codón 1756, localizada dentro de la región BRCT, se ha descrito que *MLH1* se une a esta región y que mutaciones en esta zona se asocian con inestabilidad de microsatélites en los tumores de mama¹⁵⁵. Se han descrito dos regiones de unión de *MLH1* en el gen *BRCA1*, en el extremo N terminal entre los codones 1-231 y en el extremo C-terminal entre los codones 1552-1861¹⁵⁵; la mutación de la línea celular *Sum149pt* se localiza en el codón 724, que está relacionado con la interacción con *RAD51*, proteína no implicada directamente en el sistema de MMR sino en la reparación de las roturas de doble cadena pero que, indirectamente, regula las proteínas del sistema MMR, lo que podría explicar la inestabilidad en esta línea celular¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

La disfunción de la proteína *BRCA1* afecta principalmente al sistema de reparación de roturas de doble cadena (DSBs, *Doble Strand Breaks*)^{159,160}, en ocasiones formando el complejo BASC con proteínas del sistema MMR (*MLH1*, *MSH2* y *MSH6*)¹⁶¹. En una situación normal, durante el apareamiento de cromosomas en la mitosis se produce la recombinación homóloga y hay intercambio de regiones cromosómicas¹⁶². Por otro lado, si existen errores en el ADN previos a la fase S del ciclo celular, las quinasas *ATM*, *ATR* y *CHECK2* fosforilan a *BRCA1*, activándola y provocando la fosforilación de proteínas como *p53* que activan la parada de ciclo celular y pueden inducir apoptosis en el caso de que el error no sea corregido^{163,164}. Si la proteína *BRCA1* no es funcional, la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga no está bien regulada, dando lugar a apareamientos erróneos de cromosomas y a intercambios de cromátidas aberrantes¹⁶⁵. Este tipo de alteración se asocia con inestabilidad cromosómica (CIN), aspecto no incluido en nuestro trabajo.

Panobinostat® modifica los niveles de acetilación de las líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de mama

La incubación de líneas celulares derivadas de cáncer de colon y mama con Panobinostat® mostró un incremento progresivo de la acetilación de la lisina 9 de la histona 3 (fig. 23), lo que permitiría que los grupos acetilo de las colas de las histonas neutralicen la carga positiva de la lisina, debilitando la interacción con el ADN, y favoreciendo el acceso de los factores y la maquinaria de la transcripcional²⁵. La consecuencia de este proceso sería que, en situaciones en las que la actividad de las proteínas HDAC está elevada^{95,166} y haya silenciamiento de genes, algunos de ellos supresores tumorales, el tratamiento con Panobinostat® podría facilitar su reexpresión^{167,168}.

La acetilación de las lisinas de las histonas depende de la actividad de un “writer” como las HATs y un “eraser” como las HDAC que regulan el nivel de acetilación en función de las necesidades celulares¹⁶⁹. Existen múltiples estudios en los que se ha demostrado que una desregulación de este equilibrio por sobreexpresión de proteínas HDAC puede favorecer el desarrollo tumoral⁹¹⁻⁹⁴. En nuestro trabajo hemos estudiado los niveles de expresión basal de las proteínas HDAC de Clase I (HDAC1, HDAC2 y HDAC3) y su modificación tras el tratamiento con el inhibidor de HDAC Panobinostat®. El análisis de la expresión basal de estas HDAC en las líneas de adenocarcinoma colorectal incluidas en nuestro trabajo (*HCT116* y *HT29*) muestra una discreta expresión basal de HDAC1 en ambas líneas; ligeramente mayor de HDAC3 y muy alta de HDAC2; datos similares a los observados por *Spurling et al.* en líneas celulares de adenocarcinoma colorectal¹⁷⁰. El tratamiento con Panobinostat® de ambas líneas celulares modificó los niveles de expresión, de manera que en la línea celular *HCT116* los niveles de expresión de HDAC1 y HDAC2 se redujeron a las 72h mientras que HDAC3 dejó de expresarse a partir de las 24 horas. En el caso de la línea celular *HT29*, los niveles de expresión de HDAC1 y HDAC3 se mantuvieron prácticamente similares durante las 72 horas de tratamiento; pero los niveles de HDAC2 se redujeron considerablemente tras 24 horas de incubación.

La diferencia en los niveles de expresión basal de HDAC2 que observamos entre las líneas celulares *HCT116* y *HT29* podría explicarse por la presencia de una mutación inactivante del gen supresor tumoral APC en la línea celular *HT29* que da lugar a dos

proteínas truncadas en el extremo C-terminal de ~100 y 200 kDa¹⁷¹. Se ha descrito que una señalización defectuosa de la vía APC/ β -catenina/c-Myc puede llevar a un funcionamiento aberrante de la maquinaria de represión transcripcional dependiente de HDAC2 y, por tanto, elevar los niveles de la proteína⁹⁵.

El análisis de los niveles de expresión de las proteínas HDAC de Clase I de un panel de líneas celulares de cáncer de mama (tabla 7) tras el tratamiento durante 72 horas con Panobinostat®, mostró que existe una diferencia en los niveles de expresión de las proteínas HDAC que es específico para cada línea celular. Está demostrado que la proteína BRCA1 tiene un sitio de unión a HDAC1 y HDAC2, y que forman un complejo con actividad remodeladora de la cromatina¹⁷². Por otra parte, se ha analizado mediante inmunohistoquímica la expresión de proteínas HDAC en diversos tipos de tumores de mama observándose una mayor expresión de HDAC2 en los tumores que expresan receptores hormonales¹⁷³. Aunque nuestro trabajo no hemos determinado los niveles de HDAC mediante inmunohistoquímica sino mediante western blot, hemos detectado niveles basales de HDAC2 muy bajos, probablemente debido a que, excepto *MCF7*, todas las líneas son triple negativas y, por tanto, no expresan HER2. No obstante, las líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo *MDA-MB-231* y *BT549* presentan una alta expresión de HDAC2, lo que sugiere que otros factores, además de la ausencia de expresión de receptores hormonales y HER2, se asocian con los niveles de expresión de HDAC. Es de resaltar la ausencia de correlación entre los niveles de expresión de estas proteínas y la presencia de mutaciones en BRCA1, lo que descarta un papel regulador directo de BRCA1 sobre los niveles de expresión de las HDAC tipo I.

Panobinostat® modifica la viabilidad de líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de mama

Está bien caracterizado que Panobinostat® induce muerte celular alterando diferentes vías celulares, entre ellas apoptosis por estrés del retículo endoplasmático.

La incubación de las líneas celulares incluidas en nuestro trabajo con Panobinostat® a las concentraciones de 50, 75, 100 y 150nM nos permitió analizar la viabilidad de las mismas tras la exposición al fármaco. Las líneas celulares de cáncer colorectal presentaron

respuestas muy similares, mostrando una clara inhibición de la capacidad proliferativa a las dosis más inferiores (fig. 25), por lo que la presencia o ausencia de función del gen MLH1 no parece modificar la viabilidad celular en respuesta a un inhibidor de HDAC como el Panobinostat®. Este resultado contrasta con el obtenido por el grupo de *Imesch et al.* quienes, utilizando otro inhibidor de HDAC derivado del ácido hidroxámico, la Tricostatina, observaron que la ausencia de función de MLH1 favorecía la resistencia de las líneas celulares¹⁷⁴. Sin embargo, Panobinostat® presenta mayor actividad inhibitoria de HDAC y citotóxica que la Tricostatina, lo que podría explicar las diferencias. Por otra parte, al analizar la fase del ciclo celular de las células incubadas con Panobinostat® observamos que el número de células paradas en fase G2/M es mucho mayor en la línea *HT29* que en la línea *HCT116*, lo que sugiere que la ausencia de MLH1 dificulta la parada en esta etapa del ciclo celular. Es conocida la necesidad de un correcto funcionamiento del sistema de MMR para la activación del punto de control de ciclo celular en G2¹⁷⁵. La parada de ciclo celular en G2 origina un incremento de muerte celular si el ciclo celular no es capaz de progresar¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Se ha sugerido que la hiperacetilación de las histonas pericentroméricas inducida por el tratamiento con inhibidores de HDAC provoca fallos en el ensamblaje de los microtúbulos al cinetocoro y, por tanto, parada de la mitosis^{179,180}.

Está descrito que fallos en las proteínas p53, RB1 y BRCA1 cooperan en el desarrollo de cáncer de mama¹⁸¹; de hecho, mutaciones germinales en los genes p53 y BRCA1 predisponen al desarrollo de este tumor¹⁸². Es conocido que cuando hay errores en el ADN se activan quinasas como ATM, ATR y CHECK2 que fosforilan a BRCA1 que, a su vez, activa y fosforila a la proteína p53 induciendo la parada de ciclo celular. Cuando no hay una proteína p53 funcional, bien por falta de fosforilación, debido a una proteína BRCA1 inactiva¹⁸¹, por exceso de desacetilación por aumento de la expresión de proteínas HDAC¹⁸³ o por mutación, este mecanismo no se activa y, por tanto, no se produce la parada del ciclo celular en caso de errores en el ADN. Por otra parte, cuando BRCA1 es activado por los mecanismos que detectan fallos en el ADN, se desencadena una cascada que activa a la proteína RB1, seguida de su unión a factores de transcripción como E2F impidiendo que estos factores activen la expresión de genes de entrada en fase S del ciclo celular^{184,185}. La ausencia de activación de RB1 puede ser secundaria a la presencia de una proteína BRCA1 funcional o por exceso de actividad desacetilasa¹⁸⁶. En el caso de las líneas de cáncer de mama incluidas en nuestro

trabajo, observamos como las líneas de mama triple negativas y con BRCA1 y p53 mutado, *HCC1937* y *Sum149pt*, presentan una sensibilidad al compuesto menor que el resto de líneas celulares, lo que sugiere que la presencia de mutaciones en el gen BRCA1 disminuye el efecto del tratamiento con Panobinostat® y no parece ser un candidato al tratamiento de este subtipo de tumores (fig. 27 y 29).

No obstante, la línea *BT549*, que no es portadora de mutación en BRCA1, presenta un comportamiento similar a las dos líneas con BRCA1 mutado (fig. 29). Esta línea celular presenta mutación en p53 como las dos anteriores y en RB1 como la línea *HCC1937* por lo que probablemente la mutación de los dos genes supresores tumorales ejerce un efecto similar al de la mutación de BRCA1. No obstante, en este caso no hemos explorado la posibilidad de metilación de la región promotora de BRCA1, que es otro mecanismo de silenciamiento génico que podría explicar el comportamiento de esta línea celular.

El análisis de la fase del ciclo celular en estas tres líneas celulares mostró un comportamiento similar, con un discreto incremento de la muerte celular, un poco mayor en la línea *Sum149pt*, a elevadas concentraciones del compuesto (fig. 30, 31 y 32). No obstante, mientras que en las líneas portadoras de mutación en BRCA1 se observa un elevado porcentaje de células en fase G0/G1, en la línea *BT549* la mayoría de las células están bloqueadas en fase G2/M, lo que sugiere la existencia de alteraciones en una vía diferente a la de BRCA1. Las células con mutaciones en los genes supresores de tumores como p53 o RB1 presentan dificultades para detener el ciclo celular en fase G0/G1 y por eso proliferan.

El papel de las proteínas p53 y RB1 en el mecanismo de control de ciclo celular tanto en fase G1 como en fase G2 del ciclo celular^{181,187} puede ser clave en la resistencia de la línea *BT549*.

Por último, las líneas *MCF7*, *MDA-MB-231* y *hs578t* presentan una elevada mortalidad en respuesta al tratamiento con Panobinostat®, lo que sugiere que tumores con estas características podrían beneficiarse de tratamientos con inhibidores de histonas desacetilasas (fig. 28 y 30).

Una de las razones que podrían explicar el incremento del número células paradas en fase G2 tras el tratamiento con Panobinostat® es la falta de desacetilación de proteínas

de regulación del huso mitótico como Aurora A y Aurora B. Se ha visto que las proteínas Aurora quinasa A (AURKA) y Aurora quinasa B (AURKB) se mantienen hiperacetiladas durante la fase estacionaria del ciclo celular. Cuando se inicia la división, al final de la fase S y principio de G2, sufren una desacetilación por parte de las proteínas HDAC3 y HDAC6 que provoca un cambio conformacional que las activa^{137,206,207}. Tras el tratamiento con Panobinostat®, estas dos proteínas no se desacetilan y, por tanto, se mantienen en estado de baja actividad¹³⁷ (fig. 33). Sin la actividad de estas dos proteínas, no se produce un correcto ensamblaje de los microtúbulos a los cromosomas durante la mitosis y se induce la activación de punto de restricción de G2¹⁸⁸ y la posterior muerte celular¹³⁷.

Tras observar el elevado número de células que se mantienen en fase G2/M tras el tratamiento con Panobinostat®, decidimos analizar los niveles de expresión de AURKA y AURKB en todas las líneas celulares tras 72 horas en presencia del compuesto a una concentración de 50nM. Nuestros resultados muestran la ausencia de expresión de AURKA en todas las líneas celulares tras la exposición a Panobinostat durante 72h. En el caso de AURKB los efectos no son tan dramáticos como en el casos de AURKA, probablemente porque los niveles basales de esta proteína son mayores en todas las líneas celulares, aunque se observa una disminución de la expresión de esta proteína en respuesta al tratamiento con Panobinostat en todos los casos excepto en la línea celular *MDA-MB-231*. Estos resultados sugieren que Panobinostat® podría ser utilizado como terapia en aquellos tumores que presentaran sobreexpresión de AURKA o AURKB. Recientemente se ha descrito que variaciones en la expresión de AURKA y AURKB modifican el pronóstico de las mujeres con cáncer de mama¹⁸⁹. Altos niveles de expresión de estas proteínas se han relacionado con mal pronóstico de pacientes de cáncer de mama¹⁹⁰. Concretamente, pacientes con cáncer de mama con expresión de receptor de estrógenos, presentan un peor pronóstico cuando existe sobreexpresión de AURKA y AURKB¹⁹⁰. Nuestros resultados, muestran que el tratamiento de las líneas celulares con Panobinostat® reduce los niveles de ambas proteínas por lo que podríamos especular con que el tratamiento con Panobinostat® de pacientes con tumores ER-positivos que sobreexpresen AURKA y AURKB poder mejorar su pronóstico.

Panobinostat® modifica el proteoma de líneas celulares derivadas de cáncer de colon y mama

El análisis del proteoma de las líneas celulares derivadas de cáncer de colon y mama incluidas en nuestro estudio mediante electroforesis bidimensional (2-DE), mostró que el tratamiento con Panobinostat® modifica la expresión proteica tras 72 horas de incubación, aunque cada una de las líneas presenta modificación en los niveles de expresión de diferentes proteínas. Analizando la localización y las rutas en las que actúan las proteínas que ven modificados sus niveles tras el tratamiento con Panobinostat®, se observan cambios en proteínas independientemente de su localización celular confirmando los resultados descritos previamente por otros grupos que muestran que la respuesta a Panobinostat® es sistémica en la célula^{191,192}.

El análisis de las proteínas desreguladas muestra que un gran número de ellas están implicadas en procesos que comprometen la supervivencia celular, aunque no hay ninguna que sea común a todas las líneas celulares estudiadas (tablas 8, 9, 10 y 11). Si analizamos los procesos celulares en los que toman parte, hay un importante grupo que están implicadas en el metabolismo glucídico (fig. 34 y 35). Esta descrito que la inhibición de las proteínas HDAC reduce los niveles de proteínas implicadas en el metabolismo de los glúcidos por falta de activación de proteínas como las de la familia FOX¹⁹³, que son factores de transcripción que también se han relacionado con tumorigénesis¹⁹⁴. Por otro lado, es bien conocido que las células tumorales presentan alteraciones en metabolismo glucídico de manera que tienen una disminución de la glucólisis aerobia incluso en presencia de oxígeno, lo que se refleja en una elevada producción de ácido láctico (efecto *Warburg*)^{195,196}. El grupo de *Thangaraju et al.* demostró que el incremento del metabolismo glucídico en las células tumorales, hasta de 200 veces comparando con una célula normal, producía un incremento en los niveles de piruvato intracelulares y que este piruvato actuaba como inhibidor intrínseco de las HDAC de Clase 1 HDAC1 y HDAC3. Para contrarrestar esta inhibición de las HDAC, la célula aumentaba la degradación del piruvato mediante glucólisis aerobia y fermentación láctica dando lugar a un incremento de los niveles de lactato¹⁹⁷. Este exceso de lactato acidifica el medio y puede ser aprovechado por la célula tumoral como nutriente y fuente de carbono favoreciendo el anabolismo, a su vez induce proteínas proangiogénicas y favorece la invasividad celular¹⁹⁶.

A la vista de que un grupo importante de las proteínas en las que hemos encontrado cambios en los niveles de expresión estaban relacionadas con el metabolismo glucídico decidimos analizar si el tratamiento con Panobinostat® modificaba la producción de ácido láctico por las células tumorales. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con el inhibidor de HDAC no modifica los niveles de ácido láctico en el medio de cultivo, por lo que no parece que su efecto esté mediado por cambios en el metabolismo glucídico de las células tumorales (fig. 36).

Por otra parte, varias enzimas que aparecen desreguladas en nuestro estudio y están implicadas en procesos relacionados con ciclo celular e inducción de muerte, como la proteína *Histone-binding protein RBBP7*, que se ha visto que interacciona con HDAC1^{198,199}, con RB1^{172,200} y con BRCA1¹⁷² controlando el ciclo celular y la inducción de muerte. Otras proteínas relevantes que se ven desreguladas han sido *Peroxiredoxin-1*, con funciones de proliferación celular²⁰¹; *Heat shock protein beta-1* (también conocida como *Hsp27*) que es una chaperona cuyas funciones son activación de la respuesta al estrés, regulación del desarrollo celular y la inhibición de la apoptosis^{202,203}; *Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa* (también conocida como *PPP2R1A*) con funciones de control del crecimiento celular y proliferación²⁰⁴; y *Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit* implicada también en el control de la proliferación²⁰⁵.

Otro grupo de proteínas relevantes son las mitocondriales. Dentro de este grupo hemos encontrado modificación en los niveles de expresión de proteínas implicadas en procesos de proliferación celular (*Peroxiredoxin-1*)²⁰¹, transducción de señales (*Chloride intracellular channel protein*²⁰⁶ y *Dihydropyrimidinase-related protein 2*²⁰⁷) o regulación de procesos de muerte celular (*Glycyl-tARN synthetase*²⁰⁸ y *Proteasome subunit alpha type-6*²⁰⁹).

Por último, hemos encontrado variaciones en los niveles de expresión de dos pequeños grupos de proteínas: unas con actividad nuclear y otras actividad en la membrana celular. Del primer grupo destacamos proteínas como *Ras gtpase-activating protein-binding protein 1* perteneciente a la cascada de señalización del oncogén Ras²¹⁰, *Histone-binding protein RBBP7* mencionada anteriormente o *Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T* que forma parte del complejo de ubiquitinación para la degradación proteica²¹¹. Del segundo grupo

destacamos la proteína *Moesin* que tiene funciones de regulación y anclaje del citoesqueleto a membranas celulares²¹² o la ya descrita *Chloride intracellular channel protein*²⁰⁶.

Panobinostat® modifica la expresión de miARNs en líneas celulares de cáncer de colon, cáncer de mama y mieloma múltiple.

Estudios realizados por el grupo de *Maiso et al.* demostraron que Panobinostat® tenía un efecto antiproliferativo sobre células de mieloma múltiple²¹³ afectando a múltiples vías de regulación de la célula, entre ellas la expresión de miARNs. En nuestro trabajo hemos estudiado si el tratamiento con Panobinostat® modifica los niveles de expresión de miARNs en tumores sólidos de origen epitelial, observando variaciones en los niveles de miARNs que son comunes independientemente de la estirpe celular y otros específico de cada subtipo (tablas 12, 13, 14 y 15).

Estudios previos ya han demostrado que en ciertos tumores se desregulan miARNs, como es el caso de *miR-588*, en los primeros estados de desarrollo tumoral²¹⁴. En nuestro estudio hemos observado un incremento en la expresión de este miARN en los diferentes tipos celulares, no siendo específico de ningún tipo tumoral. Experimentalmente no se ha encontrado diana a este miARN, pero se ha visto que su sobreexpresión reduce la activación de metaloproteasas, por lo que se reprime considerablemente la angiogénesis²¹⁴. En nuestro estudio también hemos visto un incremento del *miR-384*, implicado en muerte celular²¹⁵. Por lo tanto, nuestro trabajo confirma que el tratamiento con Panobinostat® modifica la expresión de miARNs de los que no se tienen evidencias experimentales de su acción y de los que solo se conocen dianas a las que tienen una alta probabilidad de unirse por homología de secuencia.

Agrupando las líneas celulares de acuerdo con su estirpe celular en epiteliales o mesenquimales, encontramos que hay tres miARNs claramente sobreexpresados tanto a 24 como a 72 horas (*miR-142-3p*, *miR-142-5p* y *miR-597*) (tabla 15 y fig. 38). Los dos primeros, derivados de un mismo precursor, *miR-142*, y ya han sido descritos previamente sobreexpresados en tumores hematopoyéticos²¹⁶⁻²¹⁸ pero no se había visto en tumores epiteliales. Se ha observado que este miARN reprime la inhibición de crecimiento celular inducida por TFG-β, por lo que su sobreexpresión favorecería la progresión tumoral. En el

caso de *miR-597* no ha sido estudiado hasta el momento y solo ha sido caracterizado en las bases de datos. En el caso de *miR-602*, nuestro trabajo muestra que se encuentra infraexpresado en ambos tipos de líneas celulares; se ha observado la desregulación de este miARN en el desarrollo de carcinoma hepatocelular tras la infección por el virus de la hepatitis B²¹⁹, aunque no se conoce una diana específica. Este miARN se ha asociado con la regulación de la ruta del gen oncosupresor *RASSF1A*. Dentro del grupo de miARNs sobreexpresados a las 72 horas destacamos el *miR-518a-5p* que se ha visto que regula la expresión de la proteína CCR6 implicada en la maduración de células B²²⁰ y relacionada con la enfermedad de Crohn²²¹ por lo que podría existir una relación directa con el carcinoma colorrectal (tabla 15 y fig. 38).

Comparación de células tumorales epiteliales frente a mesenquimales

La comparación de la expresión de miARNs entre las líneas celulares tras el tratamiento con Panobinostat® a las 24 y a las 72 horas, mostró que había dos grupos claramente diferenciados de miARNs que tenían diferente expresión entre células mesenquimales y epiteliales (fig. 38). La comparación a las 24 horas mostró un elevado número de miARNs con dianas conocidas y un pequeño grupo del que solo existe la descripción pero no la diana del miARN (fig. 39). Por lo tanto, la respuesta a Panobinostat® varía dependiendo de la estirpe embrionaria de la célula tumoral y, además, permite predecir la estirpe celular, lo que podría ser útil para el diagnóstico de metástasis de origen indeterminado.

Hay que destacar el cuarto grupo de dianas observado a las 24 horas. En este grupo existe una diferencia en la expresión para la línea de mama *HCC1937*, con niveles de expresión de miARNs que difieren con las otras dos líneas celulares epiteliales, asemejándose más a la expresión de las líneas celulares mesenquimales (fig. 39). Este grupo de miARN tiene como dianas un número importante de genes dentro de las que caben destacar dianas como *ErbB4*, *VEGF*, *TP63* y varias CDKs importantes en el control del ciclo celular, por consiguiente, la desregulación de estos miARNs tendría un efecto directo sobre el control de la proliferación y del ciclo celular.

Por otra parte, en la comparación a 72 horas de las líneas epiteliales y mesenquimales cabe destacar la presencia diferencial del ya mencionado *miR-142-3p* entre ambas líneas, mucho más sobreexpresado en las mesenquimales favoreciéndose la capacidad proliferativa (fig. 40). Por otro lado, también es destacable el *miR-767-3p* y *miR-648* que están relacionados con la regulación del gen *MGMT*, enzima responsable de la reparación del ADN y relacionada con resistencias a agentes alquilantes en glioblastomas²²² (fig. 40). La sobreexpresión de estos miARNs provoca degradación del transcrito que codifica la proteína reparadora *MGMT*, por tanto, no se eliminan los grupos metilo de la guanina metiladas, produciéndose apareamientos erróneos de bases y favoreciendo la carcinogénesis²²².

DECITABINA® MUESTRA POCA ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA

La incubación de las líneas celulares derivadas de cáncer de colon y mama con el fármaco desmetilante Decitabina® mostró una relación directa entre la concentración del compuesto y la tasa de proliferación, requiriéndose dosis altas de compuesto para reducir discretamente la capacidad proliferativa, siendo su efecto mucho menos intenso que en el caso del Panobinostat®, manteniéndose un crecimiento celular en todas las líneas incluidas en el estudio excepto en *HCC1937* (fig. 42, 43 y 44). El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo mostró que solo la línea *HCC1937* presentaba un incremento de mortalidad celular (fig. 44). El hecho de que esta inhibición del crecimiento aparezca a 48 horas, sumado a la similitud de resultados independientemente de la dosis, sugiere que el causante de la inhibición podría no ser la acción del fármaco, sino la activación por desmetilación de algún gen que induzca senescencia o parada del ciclo celular en G_1 , activándose posteriormente rutas de muerte celular. Estos resultados concuerdan con otros estudios anteriores en los que se comprobó que la máxima desmetilación producida por el fármaco aparecía 48h tras la exposición a este^{223,224}. Sin embargo, esta línea celular presenta una mutación inactivante del gen *RB1* por lo que tiene afectado el control del ciclo celular en G_1 . La sensibilidad que presenta esta línea celular a la Decitabina® se explica porque presenta hipermetilado el promotor del gen que codifica la Caspasa 8²²⁵ por lo que, cuando

añadimos Decitabina® recuperamos la expresión del gen y los niveles de proteína favoreciendo que se activen vías pro-apoptóticas mediadas por Caspasa 8²²⁵. Algo similar ocurre con las proteínas p15²²⁴ y Maspina²²⁵, ambas proteínas supresoras tumorales, cuyos promotores también se han descrito hipermetilados en ésta línea celular y cuya reexpresión activa rutas de muerte celular^{224,225}.

PANOBINOSTAT® Y DECITABINA® ACTUAN DE MANERA SINÉRGICA SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON Y CÁNCER DE MAMA

Estudios previos realizados por otros grupos demuestran que la combinación de fármacos reguladores de la actividad epigenética modifica la proliferación celular tanto en cultivos como en modelos animales²²⁶⁻²²⁹.

Nosotros hemos analizado la respuesta a la incubación con un fármaco inhibidor de histona deacetilasas como el Panobinostat® con otro inhibidor de la metilación como la Decitabina®. Analizando las estructuras químicas de ambos compuestos observamos la existencia de grupos donde cabría la posibilidad de que se produjera una reacción de *Michael*^{230,231} entre ambos compuestos; el más claro es el carbono 19 (fig. 58) de la molécula de Panobinostat® debido a la insaturación que presenta. Con el resultado del análisis inicialmente descartamos que la posible reactividad entre ambos pudiera generar un tercer compuesto (fig. 49 y 50).

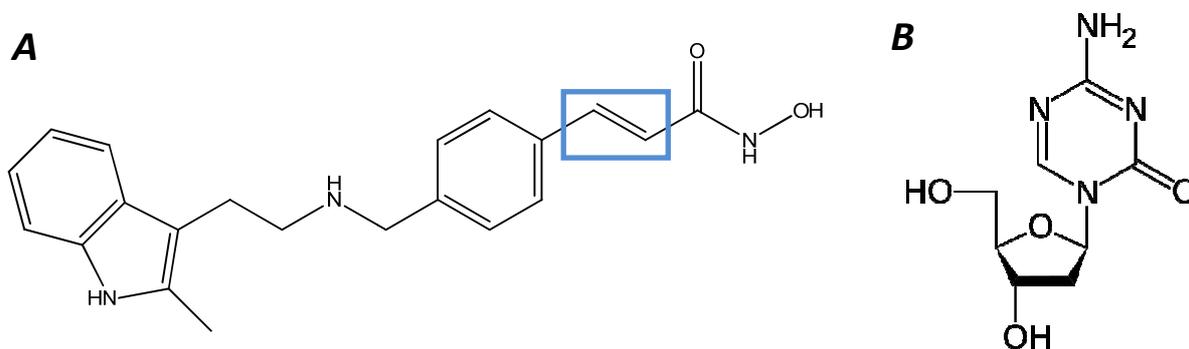


Fig. 58: Estructuras químicas de panobinostat® (A) y decitabina® (B). El rectángulo azul señala el lugar donde podría esperarse un ataque nucleofílico en la molécula de panobinostat®.

La administración conjunta de los dos fármacos reduce el efecto del Panobinostat® en las líneas celulares *HCT116* y *HT29* requiriéndose mayor tiempo de exposición a los fármacos para obtener una respuesta similar, aunque en el caso de la línea *HT29* (fig. 51) el tratamiento combinado induce una respuesta mucho menos acusada en relación con *HCT116*. Esto puede ser debido a la presencia de la mutación en p53 en la línea celular *HT29*. La deficiencia en la activación del punto de restricción de G2 por la ausencia de actividad de p53 junto a la desmetilación masiva de promotores con la consiguiente expresión génica, podría inducir una ligera recuperación de la capacidad proliferativa.

En el caso de la línea celular de cáncer de mama *MCF7* el tratamiento combinado aumenta la mortalidad observada con el tratamiento con Panobinostat® aislado, pero las diferencias son poco significativas tras 72h de tratamiento, si bien se observa un incremento de células en fase G0/G1 con el tratamiento combinado. El estudio de la respuesta de las líneas *BT549* y *SUM149Pt* muestra un claro efecto sinérgico tras 72 horas. El análisis de las líneas celulares *hs578t* y *MDA-MB-231* muestra un efecto inhibitor de la mortalidad celular en relación con el efecto de Panobinostat® aislado, más evidente en la última. Por el contrario, la línea celular *HCC1937*, que era poco sensible al efecto del Panobinostat® y muy sensible a la Decitabina®, se observa una disminución de la mortalidad inducida por esta última, aunque a 72h la mortalidad alcanza niveles similares a los del Panobinostat® aislado.

Estos resultados sugieren que el efecto combinado de ambos fármacos no depende de la presencia de mutaciones en BRCA1 y que deberemos buscar otras dianas moleculares que permitan explicar este diferente comportamiento.

Tanto la hipermetilación como la desacetilación de las histonas provocan silenciamiento transcripcional. Las evidencias previas sugieren que estos procesos a menudo no son independientes entre sí²³², lo que apoyaría el uso de nuestros dos compuestos combinados. El estudio de Jones *et al* demuestra que al ADN metilado se une el represor transcripcional MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*) a través del dominio de unión a sitios CpG metilados. MeCP2 entonces recluta y se une al complejo desacetilasa Sin3/histona apoyando la estructura cerrada de la cromatina²³². En nuestro caso, podríamos explicar los resultados de los efectos sinérgicos de la exposición a los dos compuestos de forma que la desmetilación producida tras 24 horas de tratamiento con Decitabina® requiere de

Panobinostat®, que mantiene los niveles de acetilación, para la reexpresión efectiva de genes que estaban silenciados por metilación, mientras que tras 72 horas de tratamiento la respuesta se incrementa debido a la activación de otros genes por el efecto concomitante de la acetilación. Diversos estudios demuestran que hay genes supresores tumorales que se encuentran silenciados por hipermetilación de promotores o por exceso de desacetilación, como p53, p16 o p21 cuya reexpresión puede reducir la capacidad tumorigénica de las líneas celulares²³³. Además, cuanto mayor es la tasa de división de la célula, antes se ven los efectos del tratamiento ya que Decitabina® se incorpora más rápidamente al ADN.

Ahora bien, dado que la metilación del ADN es un proceso producido específicamente en fase S²³⁴, es conveniente tener en cuenta la tasa de división de cada línea celular. Si la línea analizada tuviese una tasa de división no muy rápida, serían necesarias exposiciones más largas a Decitabina® para así poder exponer la mayor cantidad de células posibles en fase S al inhibidor. Por otro lado, Panobinostat® junto a otros inhibidores de HDAC, como ya hemos comentado, inducen parada del crecimiento en fases G0/G1 y en fase G2/M tras 72h de exposición por lo que sería deseable alcanzar un equilibrio entre la exposición óptima a Decitabina® durante la fase S y la exposición a Panobinostat® antes de las fases G0/G1 o previo a la entrada en mitosis para inducir la parada de ciclo celular y activar vías apoptóticas.

Son necesarios más estudios para definir qué mecanismos moleculares hacen más sensibles al tratamiento combinado de los dos fármacos modificadores epigenéticos en tumores sólidos y poder plantear tratamientos específicos a cada subtipo tumoral.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Nuestro trabajo confirma que la presencia de mutaciones en los genes reparadores MLH1 y BRCA1 altera el sistema MMR e induce inestabilidad de microsatélites tanto en cáncer de colon como de mama.
2. Las líneas celulares que presentan mutaciones en los genes BRCA1, p53 y Rb1 muestran resistencia al tratamiento con Panobinostat®, lo que indica que el tratamiento con este fármaco requiere un estudio molecular previo del tumor para aumentar la especificidad del tratamiento.
3. En nuestro trabajo confirmamos que Panobinostat® modifica los niveles de expresión de diferentes miARNs de manera diferente dependiendo de la línea celular, lo que confirma que este fármaco tiene un efecto específico dependiendo de la estirpe tumoral.
4. Nuestros resultados muestran que Panobinostat® disminuye los niveles de AURKA y AURKB por lo que podría ser utilizado como tratamiento complementario en tumores de mama que muestren sobreexpresión de estas proteínas.
5. El tratamiento con Decitabina mostró un efecto muy limitado sobre la viabilidad de las líneas celulares tumorales incluidas en nuestro estudio, lo que plantea dudas sobre la idoneidad de emplear este fármaco aislado en el tratamiento de tumores de colon y mama.
6. El tratamiento sinérgico con Panobinostat® y Decitabina® refuerza el efecto de ambos fármacos por separado, siendo el efecto mucho más evidente en el caso de la Decitabina. No obstante, la respuesta es muy variable entre las diferentes líneas celulares incluidas en nuestro trabajo siendo necesarios más estudios para definir el tipo de tumores que se pueden beneficiar del tratamiento combinado.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal, A. et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90 (2011).
2. Lopez-Abente, G. et al. [State of cancer in Spain: incidence]. *An Sist Sanit Navar* **27**, 165-73 (2004).
3. Hahn, W.C. et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464-8 (1999).
4. Conde-Perezprina, J.C., Leon-Galvan, M.A. & Konigsberg, M. DNA mismatch repair system: repercussions in cellular homeostasis and relationship with aging. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 728430 (2012).
5. Martinez, N.J. & Walhout, A.J. The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *Bioessays* **31**, 435-45 (2009).
6. Tomilin, N.V. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *Bioessays* **30**, 338-48 (2008).
7. Brueckner, F. et al. Structure-function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 112-20 (2009).
8. Szyf, M. The early life environment and the epigenome. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 878-85 (2009).
9. Waddington, C.H. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* **41**, 10-3 (2012).
10. Suzuki, M.M. & Bird, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* **9**, 465-76 (2008).
11. Bannister, A.J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381-95 (2011).
12. Storz, G. An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* **296**, 1260-3 (2002).
13. Bhasin, M., Reinherz, E.L. & Reche, P.A. Recognition and classification of histones using support vector machine. *J Comput Biol* **13**, 102-12 (2006).
14. Georgel, P.T. & Hansen, J.C. Linker histone function in chromatin: dual mechanisms of action. *Biochem Cell Biol* **79**, 313-6 (2001).
15. Allfrey, V.G., Faulkner, R. & Mirsky, A.E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 786-94 (1964).
16. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-60 (1997).
17. Woodcock, C.L. & Ghosh, R.P. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000596 (2010).
18. Segal, E. & Widom, J. What controls nucleosome positions? *Trends Genet* **25**, 335-43 (2009).
19. Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G. & Cremer, T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* **8**, 104-15 (2007).
20. Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R. & Young, R.A. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**, 77-88 (2007).
21. Schones, D.E. et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**, 887-98 (2008).
22. Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J. & Allis, C.D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 983-94 (2007).
23. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705 (2007).
24. Tsukada, Y. et al. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-6 (2006).
25. Peserico, A. & Simone, C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 371832 (2011).
26. Bannister, A.J. & Kouzarides, T. Reversing histone methylation. *Nature* **436**, 1103-6 (2005).

27. Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D. & Patel, D.J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1025-40 (2007).
28. Sanchez, R. & Zhou, M.M. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**, 659-65 (2009).
29. Yang, X.J. & Seto, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**, 5310-8 (2007).
30. Hodawadekar, S.C. & Marmorstein, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* **26**, 5528-40 (2007).
31. Tjeertes, J.V., Miller, K.M. & Jackson, S.P. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO J* **28**, 1878-89 (2009).
32. Parthun, M.R. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* **26**, 5319-28 (2007).
33. Thiagalingam, S. et al. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* **983**, 84-100 (2003).
34. Hubbert, C. et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455-8 (2002).
35. Gao, Y.S. et al. Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis. *Mol Cell Biol* **27**, 8637-47 (2007).
36. Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F. & Atadja, P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* **277**, 25748-55 (2002).
37. Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U. & Klose, R.J. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* **66**, 407-22 (2009).
38. Bedford, M.T. & Clarke, S.G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**, 1-13 (2009).
39. Xiao, B. et al. Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* **421**, 652-6 (2003).
40. Zhang, X. et al. Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases. *Mol Cell* **12**, 177-85 (2003).
41. Briggs, S.D. et al. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**, 498 (2002).
42. Bannister, A.J., Schneider, R. & Kouzarides, T. Histone methylation: dynamic or static? *Cell* **109**, 801-6 (2002).
43. Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y. & Bruick, R.K. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **318**, 444-7 (2007).
44. Shi, Y. et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-53 (2004).
45. Klose, R.J. & Zhang, Y. Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 307-18 (2007).
46. Whetstone, J.R. et al. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**, 467-81 (2006).
47. Mosammaparast, N. & Shi, Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem* **79**, 155-79 (2010).
48. Oki, M., Aihara, H. & Ito, T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem* **41**, 319-36 (2007).
49. Hu, S. et al. Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling. *Cell* **139**, 610-22 (2009).
50. Cuthbert, G.L. et al. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545-53 (2004).
51. Sakabe, K., Wang, Z. & Hart, G.W. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19915-20 (2010).

52. Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M. & Hottiger, M.O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 789-829 (2006).
53. Cao, J. & Yan, Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol* **2**, 26 (2012).
54. Wang, H. et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-8 (2004).
55. Kim, J. et al. RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* **137**, 459-71 (2009).
56. Sriramachandran, A.M. & Dohmen, R.J. SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta* (2013).
57. Shiio, Y. & Eisenman, R.N. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13225-30 (2003).
58. Mostoslavsky, R. & Bergman, Y. DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F29-50 (1997).
59. Meng, C.F., Zhu, X.J., Peng, G. & Dai, D.Q. Role of histone modifications and DNA methylation in the regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in human stomach cancer cells. *Cancer Invest* **28**, 331-9 (2010).
60. Iqbal, K., Jin, S.G., Pfeifer, G.P. & Szabo, P.E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3642-7 (2011).
61. Wossidlo, M. et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* **2**, 241 (2011).
62. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**, 245-54 (2003).
63. Syeda, F. et al. The replication focus targeting sequence (RFTS) domain is a DNA-competitive inhibitor of Dnmt1. *J Biol Chem* **286**, 15344-51 (2011).
64. Fujino, T. et al. PCCX1, a novel DNA-binding protein with PHD finger and CXXC domain, is regulated by proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 305-10 (2000).
65. Callebaut, I., Courvalin, J.C. & Mornon, J.P. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Lett* **446**, 189-93 (1999).
66. Jeltsch, A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem* **3**, 274-93 (2002).
67. Gowher, H. & Jeltsch, A. Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **3**, 1062-8 (2004).
68. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-97 (2004).
69. Bentwich, I. et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* **37**, 766-70 (2005).
70. Sontheimer, E.J. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 127-38 (2005).
71. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-9 (2004).
72. Kim, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 376-85 (2005).
73. Zhao, Y., Samal, E. & Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**, 214-20 (2005).
74. Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. & Hannon, G.J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* **16**, 2733-42 (2002).

75. Kloosterman, W.P., Wienholds, E., Ketting, R.F. & Plasterk, R.H. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res* **32**, 6284-91 (2004).
76. Hutvagner, G. & Zamore, P.D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-60 (2002).
77. Lu, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-8 (2005).
78. He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-33 (2005).
79. Sharma, S., Kelly, T.K. & Jones, P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27-36 (2010).
80. Wales, M.M. et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* **1**, 570-7 (1995).
81. Best, J.D. & Carey, N. Epigenetic opportunities and challenges in cancer. *Drug Discov Today* **15**, 65-70 (2010).
82. Di Marcotullio, L., Canettieri, G., Infante, P., Greco, A. & Gulino, A. Protected from the inside: endogenous histone deacetylase inhibitors and the road to cancer. *Biochim Biophys Acta* **1815**, 241-52 (2011).
83. Atadja, P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer Lett* **280**, 233-41 (2009).
84. Marks, P.A. & Jiang, X. Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle* **4**, 549-51 (2005).
85. Shi, B.W. & Xu, W.F. The development and potential clinical utility of biomarkers for HDAC inhibitors. *Drug Discov Ther* **7**, 129-136 (2013).
86. New, M., Olzscha, H. & La Thangue, N.B. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol Oncol* **6**, 637-56 (2012).
87. Kanwal, R. & Gupta, S. Epigenetics and cancer. *J Appl Physiol (1985)* **109**, 598-605 (2010).
88. Gelmetti, V. et al. Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol* **18**, 7185-91 (1998).
89. Khan, O. & La Thangue, N.B. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol* **90**, 85-94 (2012).
90. Cai, Y. et al. The effects of a histone deacetylase inhibitor on biological behavior of diffuse large B-cell lymphoma cell lines and insights into the underlying mechanisms. *Cancer Cell Int* **13**, 57 (2013).
91. Halkidou, K. et al. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* **59**, 177-89 (2004).
92. Choi, J.H. et al. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* **92**, 1300-4 (2001).
93. Wilson, A.J. et al. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* **281**, 13548-58 (2006).
94. Zhang, Z. et al. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. *Breast Cancer Res Treat* **94**, 11-6 (2005).
95. Zhu, P. et al. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**, 455-63 (2004).
96. Huang, B.H. et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* **12**, 395-404 (2005).
97. Song, J. et al. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS* **113**, 264-8 (2005).
98. Chittur, S.V., Sangster-Guity, N. & McCormick, P.J. Histone deacetylase inhibitors: a new mode for inhibition of cholesterol metabolism. *BMC Genomics* **9**, 507 (2008).
99. Li, J. et al. Expression and functional characterization of recombinant human HDAC1 and HDAC3. *Life Sci* **74**, 2693-705 (2004).

100. Qian, D.Z. et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res* **12**, 634-42 (2006).
101. Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M. & Schreiber, S.L. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4389-94 (2003).
102. Drummond, D.C. et al. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 495-528 (2005).
103. Johnstone, R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 287-99 (2002).
104. Peart, M.J. et al. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* **63**, 4460-71 (2003).
105. Ruefli, A.A. et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10833-8 (2001).
106. Adams, J.M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-6 (1998).
107. Qiu, L. et al. Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell* **11**, 2069-83 (2000).
108. Giannini, G., Cabri, W., Fattorusso, C. & Rodriguez, M. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. *Future Med Chem* **4**, 1439-60 (2012).
109. Rangwala, S., Zhang, C. & Duvic, M. HDAC inhibitors for the treatment of cutaneous T-cell lymphomas. *Future Med Chem* **4**, 471-86 (2012).
110. Shao, W. et al. Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance. *Int J Cancer* **127**, 2199-208 (2010).
111. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-73 (2002).
112. Hammoud, S.S., Cairns, B.R. & Jones, D.A. Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **25**, 177-83 (2013).
113. Issa, J.P. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 1634-7 (2007).
114. Thomas, X. DNA methyltransferase inhibitors in acute myeloid leukemia: discovery, design and first therapeutic experiences. *Expert Opin Drug Discov* **7**, 1039-51 (2012).
115. Khan, H., Vale, C., Bhagat, T. & Verma, A. Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* **50**, 16-37 (2013).
116. Toyota, M. & Issa, J.P. Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors. *Semin Oncol* **32**, 521-30 (2005).
117. Cote, S. & Momparler, R.L. Activation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2'-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* **8**, 56-61 (1997).
118. Toyota, M. et al. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res* **60**, 4044-8 (2000).
119. Christman, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483-95 (2002).
120. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-63 (2004).
121. Cheng, J.C. et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* **95**, 399-409 (2003).
122. Momparler, R.L., Cote, S. & Eliopoulos, N. Pharmacological approach for optimization of the dose schedule of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) for the therapy of leukemia. *Leukemia* **11 Suppl 1**, S1-6 (1997).

123. Teitz, T. et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6**, 529-35 (2000).
124. Boothman, D.A., Briggles, T.V. & Greer, S. Exploitation of elevated pyrimidine deaminating enzymes for selective chemotherapy. *Pharmacol Ther* **42**, 65-88 (1989).
125. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9 (1987).
126. Smith, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).
127. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
128. Cabrera, N., Diaz-Rodriguez, E., Becker, E., Martin-Zanca, D. & Pandiella, A. TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* **132**, 427-36 (1996).
129. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
130. Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. & Cottrell, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-67 (1999).
131. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63 (1983).
132. Sjoblom, T. et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**, 268-74 (2006).
133. Abaan, O.D. et al. The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer Res* **73**, 4372-82 (2013).
134. Hollestelle, A. et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* **121**, 53-64 (2010).
135. Cha, T.L. et al. Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells. *Clin Cancer Res* **15**, 840-50 (2009).
136. Bolden, J.E., Peart, M.J. & Johnstone, R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 769-84 (2006).
137. Li, Y. et al. A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity. *Genes Dev* **20**, 2566-79 (2006).
138. Park, J.H. et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective cytotoxicity through modulating Aurora-A kinase. *J Mol Med (Berl)* **86**, 117-28 (2008).
139. Diaz-Chavez, J. et al. Proteomic profiling reveals that resveratrol inhibits HSP27 expression and sensitizes breast cancer cells to doxorubicin therapy. *PLoS One* **8**, e64378 (2013).
140. Chen, G. et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res* **8**, 2298-305 (2002).
141. Montgomerie, J.Z. et al. The 28K protein in urinary bladder, squamous metaplasia and urine is triosephosphate isomerase. *Clin Biochem* **30**, 613-8 (1997).
142. Ali, S. & Coombes, R.C. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 271-81 (2000).
143. Bardhan, K. & Liu, K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers (Basel)* **5**, 676-713 (2013).
144. Vajen, B., Thomay, K. & Schlegelberger, B. Induction of Chromosomal Instability via Telomere Dysfunction and Epigenetic Alterations in Myeloid Neoplasia. *Cancers (Basel)* **5**, 857-74 (2013).
145. Singh, P.K. & Campbell, M.J. The Interactions of microRNA and Epigenetic Modifications in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)* **5**, 998-1019 (2013).
146. Lessans, S. & Dorsey, S.G. The Role for Epigenetic Modifications in Pain and Analgesia Response. *Nurs Res Pract* **2013**, 961493 (2013).

147. Liu, M.M., Chan, C.C. & Tuo, J. Epigenetics in ocular diseases. *Curr Genomics* **14**, 166-72 (2013).
148. Marsit, C.J. et al. Developmental genes targeted for epigenetic variation between twin-twin transfusion syndrome children. *Clin Epigenetics* **5**, 18 (2013).
149. Menzies, V. et al. Epigenetic alterations and an increased frequency of micronuclei in women with fibromyalgia. *Nurs Res Pract* **2013**, 795784 (2013).
150. Yoo, C.B. & Jones, P.A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 37-50 (2006).
151. Dawson, M.A. & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12-27 (2012).
152. Anne, M., Sammartino, D., Barginear, M.F. & Budman, D. Profile of panobinostat and its potential for treatment in solid tumors: an update. *Onco Targets Ther* **6**, 1613-24 (2013).
153. Boland, C.R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073-2087 e3 (2010).
154. Terdiman, J.P. et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* **120**, 21-30 (2001).
155. Quaresima, B. et al. In vitro analysis of genomic instability triggered by BRCA1 missense mutations. *Hum Mutat* **27**, 715 (2006).
156. Scully, R. et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**, 265-75 (1997).
157. Kowalczykowski, S.C. Biochemistry of genetic recombination: energetics and mechanism of DNA strand exchange. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **20**, 539-75 (1991).
158. Baumann, P., Benson, F.E. & West, S.C. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **87**, 757-66 (1996).
159. Mailand, N. et al. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* **131**, 887-900 (2007).
160. Zhao, G.Y. et al. A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* **25**, 663-75 (2007).
161. Wang, Y. et al. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14**, 927-39 (2000).
162. Kakarougkas, A. & Jeggo, P. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol* (2013).
163. Venkitaraman, A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171-82 (2002).
164. Chen, J. Ataxia telangiectasia-related protein is involved in the phosphorylation of BRCA1 following deoxyribonucleic acid damage. *Cancer Res* **60**, 5037-9 (2000).
165. Khanna, K.K. & Jackson, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**, 247-54 (2001).
166. Osada, H. et al. Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int J Cancer* **112**, 26-32 (2004).
167. Langley, E. et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* **21**, 2383-96 (2002).
168. Cress, W.D. & Seto, E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* **184**, 1-16 (2000).
169. Tarakhovskiy, A. Tools and landscapes of epigenetics. *Nat Immunol* **11**, 565-8 (2010).
170. Spurling, C.C. et al. HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog* **47**, 137-47 (2008).
171. Hsi, L.C., Angerman-Stewart, J. & Eling, T.E. Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level. *Carcinogenesis* **20**, 2045-9 (1999).

172. Yarden, R.I. & Brody, L.C. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4983-8 (1999).
173. Muller, B.M. et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer* **13**, 215 (2013).
174. Imesch, P., Dedes, K.J., Furlato, M., Fink, D. & Fedier, A. MLH1 protects from resistance acquisition by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in colon tumor cells. *Int J Oncol* **35**, 631-40 (2009).
175. Davis, T.W. et al. Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer Res* **58**, 767-78 (1998).
176. Baylin, S.B. & Ohm, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* **6**, 107-16 (2006).
177. Bali, P. et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* **280**, 26729-34 (2005).
178. Nome, R.V. et al. Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. *Mol Cancer Ther* **4**, 1231-8 (2005).
179. Taddei, A., Maison, C., Roche, D. & Almouzni, G. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* **3**, 114-20 (2001).
180. Robbins, A.R. et al. Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell Cycle* **4**, 717-26 (2005).
181. Kumar, P. et al. Cooperativity of Rb, Brca1, and p53 in malignant breast cancer evolution. *PLoS Genet* **8**, e1003027 (2012).
182. Oldenburg, R.A., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C.J. & Devilee, P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol* **63**, 125-49 (2007).
183. Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y. & Gu, W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* **133**, 612-26 (2008).
184. Wu, C.L., Zukerberg, L.R., Ngwu, C., Harlow, E. & Lees, J.A. In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* **15**, 2536-46 (1995).
185. Korenjak, M. & Brehm, A. E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 520-7 (2005).
186. Pickard, A., Wong, P.P. & McCance, D.J. Acetylation of Rb by PCAF is required for nuclear localization and keratinocyte differentiation. *J Cell Sci* **123**, 3718-26 (2010).
187. Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R. & Stark, G.R. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8493-7 (1995).
188. Adams, R.R., Carmena, M. & Earnshaw, W.C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* **11**, 49-54 (2001).
189. Ahn, S.G. et al. Prognostic discrimination using a 70-gene signature among patients with estrogen receptor-positive breast cancer and an intermediate 21-gene recurrence score. *Int J Mol Sci* **14**, 23685-99 (2013).
190. Bektas, N. et al. Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer. *BMC Cancer* **8**, 42 (2008).
191. Anne, M., Sammartino, D., Barginear, M.F. & Budman, D. Profile of panobinostat and its potential for treatment in solid tumors: an update. *Onco Targets Ther* **6**, 1613-1624 (2013).
192. Dickinson, M., Johnstone, R.W. & Prince, H.M. Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect. *Invest New Drugs* **28 Suppl 1**, S3-20 (2010).
193. Karpac, J. & Jasper, H. Metabolic homeostasis: HDACs take center stage. *Cell* **145**, 497-9 (2011).
194. Myatt, S.S. & Lam, E.W. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 847-59 (2007).

195. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-14 (1956).
196. Kim, J.W. & Dang, C.V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* **66**, 8927-30 (2006).
197. Thangaraju, M., Carswell, K.N., Prasad, P.D. & Ganapathy, V. Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J* **417**, 379-89 (2009).
198. Yao, Y.L. & Yang, W.M. The metastasis-associated proteins 1 and 2 form distinct protein complexes with histone deacetylase activity. *J Biol Chem* **278**, 42560-8 (2003).
199. Zhang, Y. et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* **13**, 1924-35 (1999).
200. Qian, Y.W. & Lee, E.Y. Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast. *J Biol Chem* **270**, 25507-13 (1995).
201. Prosperi, M.T., Ferbus, D., Karczinski, I. & Goubin, G. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J Biol Chem* **268**, 11050-6 (1993).
202. Sarto, C., Binz, P.A. & Mocarelli, P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* **21**, 1218-26 (2000).
203. Castelli, C. et al. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 227-33 (2004).
204. Haynes, J.G., Hartung, A.J., Hendershot, J.D., 3rd, Passingham, R.S. & Rundle, S.J. Molecular characterization of the B' regulatory subunit gene family of Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem* **260**, 127-36 (1999).
205. Wang, H. & Brautigan, D.L. A novel transmembrane Ser/Thr kinase complexes with protein phosphatase-1 and inhibitor-2. *J Biol Chem* **277**, 49605-12 (2002).
206. Valenzuela, S.M. et al. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J Biol Chem* **272**, 12575-82 (1997).
207. Hamajima, N. et al. A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution. *Gene* **180**, 157-63 (1996).
208. Deutscher, M.P. The eucaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex: suggestions for its structure and function. *J Cell Biol* **99**, 373-7 (1984).
209. DeMartino, G.N. et al. The primary structures of four subunits of the human, high-molecular-weight proteinase, macropain (proteasome), are distinct but homologous. *Biochim Biophys Acta* **1079**, 29-38 (1991).
210. Zhou, L., Song, G., He, B. & Hu, Y.G. A ras GTPase-activating protein-binding protein, TaG3BP, associated with the modulation of male fertility in a thermo-sensitive cytoplasmic male sterile wheat line. *Mol Genet Genomics* **286**, 417-31 (2011).
211. Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. & Chandu, D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* **31**, 137-55 (2006).
212. Lankes, W.T. & Furthmayr, H. Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8297-301 (1991).
213. Maiso, P. et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res* **66**, 5781-9 (2006).
214. Almog, N. et al. Consensus micro RNAs governing the switch of dormant tumors to the fast-growing angiogenic phenotype. *PLoS One* **7**, e44001 (2012).
215. Sudbery, I., Enright, A.J., Fraser, A.G. & Dunham, I. Systematic analysis of off-target effects in an RNAi screen reveals microRNAs affecting sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *BMC Genomics* **11**, 175 (2010).
216. Kwanhian, W. et al. MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med* **1**, 141-55 (2012).
217. Sun, Y. et al. PU.1-dependent transcriptional regulation of miR-142 contributes to its hematopoietic cell-specific expression and modulation of IL-6. *J Immunol* **190**, 4005-13 (2013).

218. Lv, M. et al. An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-alpha and cAMP/PKA pathways. *Leukemia* **26**, 769-77 (2012).
219. Yang, L. et al. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is overexpressed in hepatitis B virus-infected liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* **9**, 803-8 (2010).
220. Koumakis, E. et al. A regulatory variant in CCR6 is associated with susceptibility to antitopoisomerase-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **65**, 3202-8 (2013).
221. Wang, K. et al. Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease. *Am J Hum Genet* **84**, 399-405 (2009).
222. Kreth, S. et al. In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing. *Acta Neuropathol* **125**, 671-81 (2013).
223. Stresemann, C. & Lyko, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* **123**, 8-13 (2008).
224. Farinha, N.J. et al. Activation of expression of p15, p73 and E-cadherin in leukemic cells by different concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine). *Anticancer Res* **24**, 75-8 (2004).
225. Wu, Y., Alvarez, M., Slamon, D.J., Koeffler, P. & Vadgama, J.V. Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. *BMC Cancer* **10**, 32 (2010).
226. Hurtubise, A. & Momparler, R.L. Effect of histone deacetylase inhibitor LAQ824 on antineoplastic action of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on human breast carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **58**, 618-25 (2006).
227. Xu, S. et al. Cytostatic and Apoptotic Effects of DNMT and HDAC Inhibitors in Endometrial Cancer Cells. *Curr Pharm Des* (2013).
228. Kalac, M. et al. HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL. *Blood* **118**, 5506-16 (2011).
229. Belinsky, S.A. et al. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res* **63**, 7089-93 (2003).
230. Lu, X. & Deng, L. Asymmetric aza-Michael reactions of alpha,beta-unsaturated ketones with bifunctional organic catalysts. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 7710-3 (2008).
231. Yamagiwa, N., Qin, H., Matsunaga, S. & Shibasaki, M. Lewis acid-Lewis acid heterobimetallic cooperative catalysis: mechanistic studies and application in enantioselective aza-Michael reaction. *J Am Chem Soc* **127**, 13419-27 (2005).
232. Jones, P.L. et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**, 187-91 (1998).
233. Gilbert, J., Gore, S.D., Herman, J.G. & Carducci, M.A. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clin Cancer Res* **10**, 4589-96 (2004).
234. Baylin, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **2 Suppl 1**, S4-11 (2005).

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Relación de miARN sobreexpresados e infraexpresados comunes a todas las líneas celulares tras el tratamiento con panobinostat® durante 24h.

Sobreexpresados

Nombre	Score
hsa-miR-564	6.138
hsa-miR-581	5.233
hsa-miR-596	4.879
hsa-miR-520g	4.555
hsa-miR-338-3p	4.101
hsa-miR-588	3.710
hsa-miR-657	3.680
hsa-miR-142-3p	3.314
hsa-miR-142-5p	2.833
hsa-miR-602	2.800
hsa-miR-450b-3p	2.312
hsa-miR-920	2.293
hsa-miR-600	2.157
hsa-miR-423-3p	1.844
hsa-miR-558	1.795
hsa-miR-769-3p	1.703
hsa-miR-891a	1.702
hsa-miR-483-3p	1.689
hsa-miR-362-3p	1.584
hsa-miR-646	1.535
hsa-miR-580	1.524
hsa-miR-502-5p	1.492
hsa-miR-498	1.474
hsa-miR-765	1.454
hsa-miR-518a-5p	1.440
hsa-miR-628-5p	1.411
hsa-miR-146b-3p	1.225
hsa-miR-876-5p	1.032
hsa-miR-520d-3p	0.973
hsa-miR-193a-5p	0.931
hsa-miR-566	0.901
hsa-miR-509-5p	0.858
hsa-miR-619	0.816
hsa-miR-607	0.794
hsa-miR-572	0.759
hsa-miR-634	0.757
hsa-miR-559	0.735
hsa-miR-508-5p	0.722
hsa-miR-939	0.711

hsa-miR-938	0.711
hsa-miR-429	0.681
hsa-miR-512-3p	0.635
hsa-miR-369-5p	0.561
hsa-miR-628-3p	0.541
hsa-miR-548d-5p	0.539
hsa-miR-542-5p	0.526
hsa-miR-598	0.460
hsa-miR-525-5p	0.426
hsa-miR-578	0.411
hsa-miR-198	0.406
hsa-miR-331-5p	0.295
hsa-miR-516a-5p	0.191
hsa-miR-621	0.152
hsa-miR-524-3p	0.151
hsa-miR-876-3p	0.110

Infraexpresados

<i>Nombre</i>	<i>Score</i>
hsa-miR-199b-5p	-0.023
hsa-miR-890	-0.128
hsa-miR-532-5p	-0.304
hsa-miR-384	-0.321
hsa-miR-614	-0.414
hsa-miR-889	-0.453
hsa-miR-631	-0.537
hsa-miR-569	-0.554
hsa-miR-521	-0.690
hsa-miR-515-5p	-0.721
hsa-miR-590-5p	-0.734
hsa-miR-767-3p	-0.781
hsa-miR-605	-0.837
hsa-miR-611	-0.880
hsa-miR-585	-0.883
hsa-miR-662	-1.048
hsa-miR-337-3p	-1.466
hsa-miR-346	-1.581

Tabla II. Relación de miARNs sobreexpresados e infraexpresados tras el tratamiento con panobinostat que presentan diferencias estadísticamente significativas en la expresión entre las 24 y las 72 horas realizando un test SAM con todas las líneas celulares en conjunto. Todos los índices de cambio (fold changes) representados en la figura están en escala log2. Los miARNs expresados tienen una significación estadística p-value <0.05 y un q-value =0.

Sobreexpresados

Nombre	Fold change	q-value
hsa-miR-588	83.945	0
hsa-miR-384	58.148	0
hsa-miR-590-5p	32.750	0
hsa-miR-944	30.121	0
hsa-miR-662	23.049	0
hsa-miR-643	10.714	0
hsa-miR-654-5p	6.857	0
hsa-miR-515-5p	6.047	0
hsa-miR-607	5.466	0
hsa-miR-922	5.298	0
hsa-miR-532-5p	5.056	0
hsa-miR-559	4.497	0
hsa-miR-569	3.960	0
hsa-miR-521	3.819	0
hsa-miR-582-3p	3.770	0
hsa-miR-889	3.563	0
hsa-miR-509-3-5p	3.130	0
hsa-miR-369-5p	2.774	0

Infraexpresados

Nombre	Fold Change	q-value
hsa-miR-198	0.437	0
hsa-miR-628-3p	0.339	0
hsa-miR-512-3p	0.328	0
hsa-miR-193a-5p	0.308	0
hsa-miR-939	0.279	0
hsa-miR-423-3p	0.232	0
hsa-miR-146b-3p	0.229	0
hsa-miR-492	0.218	0
hsa-miR-665	0.207	0
hsa-miR-602	0.205	0
hsa-miR-943	0.205	0
hsa-miR-657	0.195	0
hsa-miR-638	0.191	0
hsa-miR-564	0.186	0
hsa-miR-933	0.173	0
hsa-miR-765	0.112	0
hsa-miR-581	0.066	0
hsa-miR-596	0.025	0

Tabla III. Relación de miARN sobreexpresados e infraexpresados de cada uno de los grupos de líneas celulares tras el tratamiento con panobinostat® durante 24 horas y miARNs con diferencias de expresión estadísticamente significativas al comparar 24 horas con 72 horas. q-value hace referencia a la probabilidad de encontrar falsos positivos. **a.** Comparación tras 24 horas y entre 24 y 72 horas para las líneas celulares mesenquimales. **b.** Comparación para las líneas celulares epiteliales tras 24 horas y entre 24 y 72 horas.

a. Tipo Mesenquimal (después de 24h)

Sobreexpresados

Nombre	Score
hsa-miR-590-5p	2.657
hsa-miR-520f	1.882
hsa-miR-658	1.302
hsa-miR-891b	0.945
hsa-miR-369-3p	0.784
hsa-miR-342-5p	0.754
hsa-miR-548a-5p	0.700
hsa-miR-548c-3p	0.588
hsa-miR-563	0.520
hsa-miR-603	0.504
hsa-miR-548d-3p	0.439
hsa-miR-922	0.386
hsa-miR-582-3p	0.367
hsa-miR-509-3-5p	0.309
hsa-miR-383	0.192
hsa-miR-548a-3p	0.178
hsa-miR-376b	0.102

Infraexpresados

Nombre	Score
hsa-miR-654-5p	-0.013
hsa-miR-555	-0.019
hsa-miR-548b-3p	-0.038
hsa-miR-518d-3p	-0.049
hsa-miR-885-5p	-0.051
hsa-miR-551a	-0.105
hsa-miR-34c-3p	-0.126
hsa-miR-362-5p	-0.134
hsa-miR-409-3p	-0.160
hsa-miR-648	-0.203
hsa-miR-489	-0.254
hsa-miR-554	-0.288
hsa-miR-643	-0.318
hsa-miR-636	-0.322
hsa-miR-656	-0.334
hsa-miR-139-5p	-0.378

hsa-miR-641	-0.456
hsa-miR-586	-0.457
hsa-miR-640	-0.458
hsa-miR-329	-0.459
hsa-miR-518a-3p	-0.469
hsa-miR-492	-0.489
hsa-miR-887	-0.588
hsa-miR-590-3p	-0.669
hsa-miR-296-5p	-0.694
hsa-miR-484	-0.718
hsa-miR-671-3p	-0.743
hsa-miR-613	-0.782
hsa-miR-632	-0.791
hsa-miR-638	-0.885
hsa-miR-518b	-0.917
hsa-miR-542-3p	-1.054
hsa-miR-940	-1.074
hsa-miR-933	-1.213
hsa-miR-532-3p	-1.217
hsa-miR-455-3p	-1.217
hsa-miR-125a-5p	-1.302
hsa-miR-937	-1.311
hsa-miR-577	-1.486
hsa-miR-630	-1.593
hsa-miR-299-3p	-1.707
hsa-miR-944	-1.741
hsa-miR-503	-1.756
hsa-miR-665	-1.798
hsa-miR-483-5p	-1.809
hsa-miR-647	-1.928
hsa-miR-576-5p	-2.161
hsa-miR-300	-2.252
hsa-miR-615-3p	-2.283
hsa-miR-501-5p	-2.641
hsa-miR-943	-2.706
hsa-miR-331-3p	-3.511
hsa-miR-519d	-3.724
hsa-miR-574-5p	-4.373

Tipo Mesenquimal (24h vs 72h)

Sobreexpresados

Nombre	Fold change	q-value(%)
hsa-miR-590-5p	1063.935	0
hsa-miR-532-5p	41.368	0
hsa-miR-577	36.236	0

hsa-miR-586	27.798	0
hsa-miR-613	16.240	0
hsa-miR-656	15.895	0
hsa-miR-554	11.145	0
hsa-miR-346	9.621	0
hsa-miR-548d-5p	8.629	0
hsa-miR-641	8.380	0
hsa-miR-559	6.705	0
hsa-miR-125a-5p	5.949	0
hsa-miR-569	5.244	0
hsa-miR-631	5.130	0
hsa-miR-501-5p	5.022	0
hsa-miR-331-3p	4.722	0
hsa-miR-574-5p	3.265	0
hsa-miR-944	2.637	0
hsa-miR-300	2.348	0
hsa-miR-605	2.315	0

Infraexpresados

Nombre	Fold change	q-value(%)
hsa-miR-922	0.325	0
hsa-miR-658	0.299	0
hsa-miR-342-5p	0.292	0
hsa-miR-648	0.274	0
hsa-miR-558	0.270	0
hsa-miR-563	0.210	0
hsa-miR-572	0.197	0
hsa-miR-939	0.189	0
hsa-miR-628-3p	0.174	0
hsa-miR-193a-5p	0.133	0
hsa-miR-765	0.077	0
hsa-miR-512-3p	0.061	0
hsa-miR-520d-3p	0.039	0
hsa-miR-338-3p	0.031	0
hsa-miR-596	0.021	0
hsa-miR-602	0.016	0
hsa-miR-657	0.007	0
hsa-miR-520g	0.003	0
hsa-miR-581	0.001	0
hsa-miR-564	0.0003	0

b. Tipo Epitelial (después de 24h)

Sobreexpresados

Nombre	Score
hsa-miR-125a-5p	3.042
hsa-miR-665	2.884
hsa-miR-362-5p	2.656
hsa-miR-933	2.577
hsa-miR-943	2.421
hsa-miR-656	2.023
hsa-miR-630	1.994
hsa-miR-632	1.768
hsa-miR-296-5p	1.752
hsa-miR-139-5p	1.665
hsa-miR-887	1.550
hsa-miR-489	1.548
hsa-miR-542-3p	1.533
hsa-miR-501-5p	1.380
hsa-miR-519d	1.376
hsa-miR-299-3p	1.313
hsa-miR-492	1.292
hsa-miR-518a-3p	1.288
hsa-miR-554	1.094
hsa-miR-574-5p	0.938
hsa-miR-329	0.865
hsa-miR-671-3p	0.821
hsa-miR-548b-3p	0.805
hsa-miR-638	0.792
hsa-miR-937	0.758
hsa-miR-484	0.738
hsa-miR-613	0.725
hsa-miR-532-3p	0.711
hsa-miR-34c-3p	0.690
hsa-miR-640	0.655
hsa-miR-885-5p	0.626
hsa-miR-577	0.618
hsa-miR-615-3p	0.573
hsa-miR-300	0.527
hsa-miR-586	0.505
hsa-miR-590-3p	0.491
hsa-miR-384	0.483
hsa-miR-331-3p	0.479
hsa-miR-518b	0.456
hsa-miR-654-5p	0.387
hsa-miR-455-3p	0.387

hsa-miR-551a	0.355
hsa-miR-518d-3p	0.348
hsa-miR-636	0.272
hsa-miR-641	0.217
hsa-miR-409-3p	0.216
hsa-miR-503	0.175
hsa-miR-555	0.156
hsa-miR-643	0.113
hsa-miR-647	0.090
hsa-miR-940	0.077
hsa-miR-648	0.065
hsa-miR-944	0.063
hsa-miR-576-5p	0.053

Infraexpresados

Nombre	Score
hsa-miR-597	-0.080
hsa-miR-603	-0.177
hsa-miR-376b	-0.273
hsa-miR-520f	-0.283
hsa-miR-383	-0.286
hsa-miR-369-3p	-0.350
hsa-miR-509-3-5p	-0.382
hsa-miR-891b	-0.422
hsa-miR-922	-0.484
hsa-miR-548a-5p	-0.524
hsa-miR-548d-3p	-0.599
hsa-miR-342-5p	-0.608
hsa-miR-563	-0.782
hsa-miR-548a-3p	-0.900
hsa-miR-548c-3p	-0.906
hsa-miR-582-3p	-1.211
hsa-miR-658	-1.240

Tipo Epitelial (24h vs 72h)

Sobreexpresados

Nombre	Fold change	q-value(%)
hsa-miR-662	537.390	0
hsa-miR-944	389.980	0
hsa-miR-648	362.897	0
hsa-miR-384	361.272	0
hsa-miR-520d-3p	255.704	0
hsa-miR-588	102.880	0
hsa-miR-643	98.598	0
hsa-miR-628-5p	41.921	0

hsa-miR-922	34.216	0
hsa-miR-369-5p	29.815	0
hsa-miR-515-5p	10.483	0
hsa-miR-551a	9.680	0
hsa-miR-582-3p	7.970	0
hsa-miR-658	5.010	0
hsa-miR-521	3.622	0
hsa-miR-569	3.407	0
hsa-miR-563	3.244	0
hsa-miR-342-5p	3.242	0

Infraexpresados

Nombre	Fold change	q-value(%)
hsa-miR-602	0.402	0
hsa-miR-193a-5p	0.352	0
hsa-miR-939	0.332	0
hsa-miR-657	0.241	0
hsa-miR-337-3p	0.231	0
hsa-miR-887	0.228	0
hsa-miR-891a	0.145	0
hsa-miR-765	0.112	0
hsa-miR-615-3p	0.107	0
hsa-miR-638	0.102	0
hsa-miR-518a-5p	0.090	0
hsa-miR-933	0.085	0
hsa-miR-146b-3p	0.078	0
hsa-miR-423-3p	0.058	0
hsa-miR-665	0.033	0
hsa-miR-943	0.029	0

ANEXO 2

Tabla IV. Niveles de ácido láctico en los cultivos celulares pre- y postratamiento con panobinostat®.

	Tratamiento	Tiempo	Concentración de lactato (mmol/l)
HT29		OH	6.7
	Panobinostat®	24H	7.8
		48H	10.8
		72H	14.4
		Control -	24H
		48H	16.3
		72H	19.4

	Tratamiento	Tiempo	Concentración de lactato (mmol/l)
HCT116		OH	13
	Panobinostat®	24H	17.9
		48H	19.6
		72H	19.4
		Control -	24H
		48H	23.4
		72H	22.4

	Tratamiento	Tiempo	Concentración de lactato (mmol/l)
BT549		OH	4.6
	Panobinostat®	24H	6.8
		48H	13.9
		72H	21.8
		Control -	24H
		48H	14.5
		72H	23.2

	Tratamiento	Tiempo	Concentración de lactato (mmol/l)
HCC1937		OH	12.5
	Panobinostat®	24H	7.1
		48H	10.5
		72H	16.2
		Control -	24H
		48H	12.8
		72H	19

