



ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE DESACETILASA DE HISTONAS SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES

Realizado por: Laura María Ruiz Pacheco

Dirigido por:

Miguel Saceda Sánchez

María del Pilar García Morales

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Grado en Biotecnología

Facultad de ciencias Experimentales

Curso académico 2015/2016



ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	4
RESUMEN	5
1 INTRODUCCIÓN	6
1.1 EL CÁNCER.....	6
1.2 ASPECTOS BÁSICOS EN CARCINOGENÉISIS.....	7
1.3 TRICOSTATINA A COMO TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER	8
1.4 MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR POR LOS INHIBIDORES DE DESACETILASAS DE HISTONAS	10
1.5 TSA Y GLIOBLASTOMA.....	11
1.6 RESULTADOS PRELIMINARES.....	12
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
2.1 HIPÓTESIS.....	14
2.2 OBJETIVOS.....	14
3 MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 CULTIVO CELULAR	15
3.2 TRANSFECCIÓN CON siRNA	15
3.3 TRATAMIENTO CON TSA.....	16
3.4 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	16
3.5 RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	17
3.5.1 <i>Extracción del RNA total</i>	17
3.5.2 <i>Reacción de retrotranscripción</i>	17
3.5.3 <i>PCR cuantitativa a tiempo real</i>	18
3.5.4 <i>Análisis de los resultados</i>	19
3.6 GENES A ESTUDIO.....	19
4 RESULTADOS	21
4.1 EFECTO DEL TSA EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOBLASTOMA.....	21
4.2 PAPEL DE SERÍN PROTEASAS EN EL MECANISMO DE MUERTE INDUCIDA POR TSA... 23	
4.3 INHIBICIÓN MEDIANTE SIRNA DE LOS GENES DE INTERÉS Y SU EFECTO EN EL CICLO CELULAR.....	24
5 DISCUSIÓN	30
6 CONCLUSIONES	35
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	35
8 BIBLIOGRAFÍA	36

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **DNA:** ácido desoxirribonucleico
- **cDNA:** DNA complementario
- **AEBSF:** 4-(2-aminoetil)bencenosulfonil fluoruro
- **RNA:** ácido ribonucleico
- **iRNA:** RNA de interferencia
- **mRNA:** RNA mensajero
- **Ct:** ciclo umbral
- **DNEM:** medio Dulbecco's Modified Eagle.
- **DS:** desviación estándar
- **EDTA:** ácido etildiaminotetraacético
- **GAPDH:** gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
- **GB:** Glioblastoma
- **GBM:** Glioblastoma multiforme
- **HAT(s):** acetilasa/s de histonas
- **HDAC(s):** deacetilasa/s de histonas
- **iHDAC(s):** inhibidor/es de deacetilasas de histonas
- **MAPK(s):** proteína/s quinasa/s activada/s por mitógenos
- **miRNA:** micro ARN
- **MKP(s):** fosfatasa/s de MAPKs
- **ml:** mililitros
- **NAD⁺:** nicotinamida adenina dinucleótido
- **PBS:** tampón fosfato salino
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PCRq:** PCR cuantitativa
- **PTGS:** silenciamiento génico postranscripcional
- **RE:** retículo endoplasmático
- **RT-PCRq:** retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa
- **siRNA:** ARN de interferencia pequeño
- **TSA:** tricostatina A
- **UPR:** respuesta a proteínas desplegadas
- **μM:** micromolar
- **μl:** microlitro

RESUMEN

En los últimos tiempos se han desarrollado una serie de nuevas terapias antitumorales, entre ellas la terapia epigenética y en concreto la utilización de inhibidores de las desacetilasas de histonas. Estos inhibidores inducen muerte celular en células tumorales a una concentración menor que en las células no tumorales del mismo tejido, además son capaces de inducir muerte celular en modelos celulares quimiorresistentes. Desafortunadamente, estas propiedades se ven en parte contrapesadas por el efecto general sobre la transcripción de estos inhibidores que genera inespecificidad y efectos secundarios no deseados. Nuestro grupo de investigación ha obtenido resultados en diferentes modelos celulares que sugieren que los inhibidores de desacetilasas de histonas podrían actuar en la inducción de muerte celular a través de un mecanismo universal caspasa independiente y serin proteasa dependiente y que la capacidad de inducir muerte celular programada y el efecto general sobre la transcripción pueden ser separados en estos inhibidores. El presente TFG se ha centrado en demostrar que este mecanismo de inducción de muerte celular por los iHDACS está presente en cultivos primarios de glioblastoma multiforme. En este trabajo se ha utilizado la Tricostatina A como iHDAC y se ha determinado la participación de varios genes (XBP1, DUSP10 y MBPTS2) en la inducción de muerte celular por TSA en los cultivos primarios de glioblastoma.

In the last times it has been developed a list of new antitumor therapies, such as epigenetic therapy and in concrete the use of deacetylases of histones inhibitors. Those inhibitors induce cell death in tumor cells in a lower concentration than in the not tumor cells which pertain to the same tissue, they are also capable of induce cell death in chemoresistant cell models. Unfortunately, these properties will come partly counterbalanced by the general effect of the transcription of these inhibitors that generates inespecify and non-desired side effects. Our research group has achieved results in different cell models that suggest that histone deacetylases inhibitors could take part in the induction of cell death through a universal mechanism which is caspase independent and serine protease-dependent, and also we have shown that the ability to induce programmed cell death and the overall effect on the transcription can be separated in these inhibitors. The present TFG has focused on demonstrating that this mechanism of induction of cell death by the iHDACS is present in primary cultures of glioblastoma multiforme. In this research, it has been used the Trichostatin A as iHDAC and it has been determined the participation of several genes (XBP1, DUSP10 and MBPTS2) in the induction of death cell by TSA in the primary glioblastoma culture.

Palabras clave: Glioblastoma, cancer, Tricostatina A, inhibidores de desacetilasas de histonas.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier órgano. Las células cancerosas presentan alteraciones moleculares que desembocan en una pérdida del control de su proliferación (*Figura 1*), [1]. Estas células pueden, en muchos casos, adquirir la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y, eventualmente, migrar y colonizar órganos distantes del tumor primario. Las células normales, por el contrario, maduran en tipos celulares muy distintos con funciones específicas y dejan de proliferar (*Figura 1*). El aumento descontrolado en el número de células tumorales, conlleva a la formación de masas, denominadas tumores o neoplasias, que durante su expansión destruyen y sustituyen a los tejidos normales.

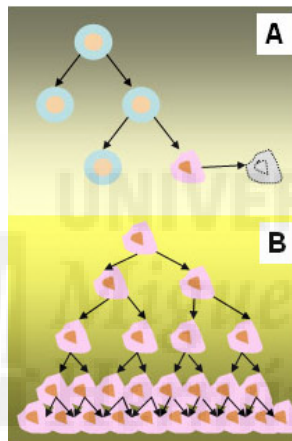


Figura 1: A. Las células normales se dividen de forma controlada. Cuando una célula normal desarrolla mutaciones que no pueden ser adecuadamente reparadas activa su propio programa de muerte. B. Las células cancerosas desarrollan mutaciones que no son reparadas e inhiben sus programas de muerte celular programada. [1]

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. En el año 2015 se diagnosticaron 231.713 nuevos casos de cáncer en España, siendo ésta la primera causa de mortalidad en nuestro país (datos Instituto Carlos III) [2]. El comportamiento, pronóstico y tratamiento de los diversos tipos de cáncer, incluso dentro de las distintas fases evolutivas de un mismo tumor, son muy diferentes, por lo que se hace necesario un diagnóstico correcto y precoz para una mayor efectividad del tratamiento.

Hoy en día, los tratamientos más comunes para el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Los dos primeros, son tratamientos localizados que requieren por lo tanto, conocer la localización específica de las lesiones neoplásicas que van a ser tratadas. Los tres tratamientos pueden alternarse y utilizarse bien

individualmente, o bien en combinación con alguno de los otros [3]. La quimioterapia consiste en tratar el cáncer con fármacos antineoplásicos de acción fuerte, normalmente inhibidores de la división celular que por lo general se administran por vía intravenosa o, que en ocasiones se pueden administrar oralmente. A diferencia de la radioterapia o la cirugía, los fármacos quimioterápicos constituyen tratamientos sistémicos que pueden utilizarse para el tratamiento de tumores que se han propagado, ya que pueden desplazarse por todo el torrente sanguíneo.

El principal problema que puede aparecer cuando se utilizan los tratamientos quimioterápicos, es la aparición de resistencia. Inicialmente, la mayoría de los tumores responden al tratamiento con fármacos antineoplásicos, sin embargo, a medida que el tratamiento avanza, se adquiere resistencia al mismo [4]. En otras palabras, las células cancerosas desarrollan mecanismos moleculares de resistencia a los efectos de la quimioterapia. El desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de tumores resistentes a los fármacos convencionales, constituye uno de los objetivos prioritarios de la investigación oncológica.

1.2 ASPECTOS BÁSICOS EN CARCINOGENÉISIS

El cáncer se origina por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en las células tumorales. Los genes afectados por estas alteraciones, pueden participar en la regulación positiva del crecimiento celular y su alteración provoca que la célula entre en un estado de proliferación continua e incontrolada, estos genes son los denominados oncogenes [5]. En colaboración con la activación de oncogenes, es también importante la inactivación de genes cuya función normal es actuar como freno de la división celular y/o como inductores de la muerte celular programada en células cuyo DNA ha sido afectado por diferentes tipos de estrés, estos genes constituyen el grupo de los llamados genes supresores de tumores [6]. Cabe detallar también los protooncogenes humanos, que controlan puntos estratégicos del crecimiento y diferenciación celular, de modo que una ganancia de función, mediante mecanismos como mutación, reordenamiento cromosómico o amplificación, los transforma en oncogenes que producen células inmortales capaces de evitar la apoptosis [7]. Aunque oncogenes y genes supresores son importantes en la génesis del cáncer también participan otros tipos de genes, desempeñando también un papel muy importante en la oncogénesis, las alteraciones en genes involucrados en la reparación del ADN.

El cáncer puede ser una enfermedad genética de base clonal si las alteraciones genéticas recaen en línea germinal y producen alelos poco frecuentes con grave afectación de la función del gen. Esto se denomina cáncer hereditario [8].

1.3 TRICOSTATINA A COMO TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER

La modulación de la estructura de la cromatina a través de acetilación/desacetilación de histonas es uno de los principales mecanismos implicados en la regulación epigenética de la expresión de genes. Son dos las actividades enzimáticas opuestas entre sí las que determinan el estado de acetilación de las histonas: histona acetiltransferasas (HATs) e histona deacetilasas (HDACs), que actúan sobre los residuos aminoácidos ubicados en las colas del amino terminal de las histonas. En general, la cromatina transcripcionalmente activa está asociada con histonas hiperacetiladas, mientras que la cromatina silenciada está vinculada a las histonas hipoacetiladas.

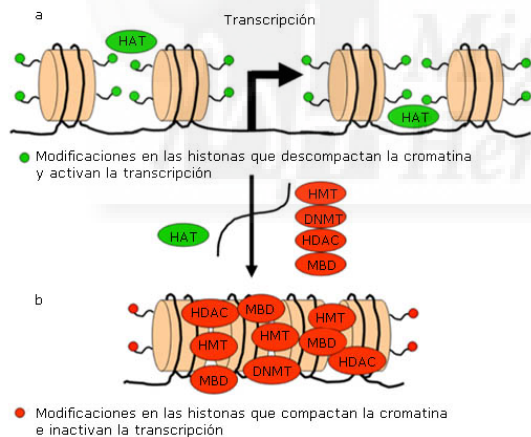


Figura 2: Regulación de la actividad transcripcional por modificación de histonas. 3a. las modificaciones en las histonas descompactan la cromatina y permiten el acceso a la maquinaria transcripcional al ADN. 3b. se observa la compactación de las histonas, evitando el acceso a la maquinaria transcripcional al ADN [2].

Se han identificado varias clases estructuralmente divergentes de inhibidores de las HDACs. Se ha demostrado que estos inhibidores son capaces de inducir la detención del ciclo celular, la diferenciación terminal o apoptosis en el cáncer de varias líneas celulares y por tanto de inhibir el crecimiento tumoral en animales [9]. En particular, el inhibidor de HDAC tricostatina A (TSA) y sus análogos de hidroxamato pueden inducir, de forma efectiva y selectiva, la detención del crecimiento tumoral en concentraciones muy bajas (nano-rango micromolar) [8].

Este antifúngico producido por *Streptomyces platensis*, es un inhibidor reversible no competitivo de la actividad HDAC en líneas celulares de mamífero. En particular inhibe las HDACs 1, 3, 4, 6, 8 y 10 con un IC₅₀ de alrededor de 20 nM, actuando como un agente quelante de Zn²⁺. Este compuesto ha presentado efectos antitumorales, ya que se ha demostrado en muchos estudios que es capaz de detener a las células en las fases G1 y G2 del ciclo celular y de inducir apoptosis. Y a pesar de que no ha progresado como candidato para ensayos clínicos por su cardiotoxicidad e inestabilidad *in vivo*, es una herramienta fundamental para la validación de enzimas HDACs como potenciales dianas antitumorales [10]. Se han realizado muchos estudios para saber cuál es el papel del TSA como inhibidor de deacetilasa de histonas, y de qué manera está relacionado con los genes que regulan el crecimiento tumoral en distintos tipos celulares, llegando a conclusiones en común acerca de las características más destacadas de este inhibidor de HDAC mencionadas posteriormente.

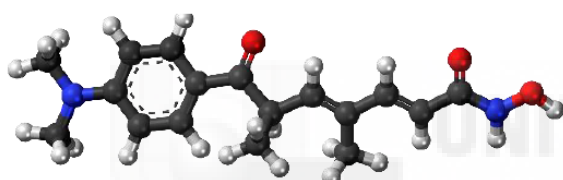


Figura 3: representación molecular de la Tricostatina A [3].

El TSA inhibe el ciclo celular eucariótico en G1 o en G2+M, eso es al principio y al final del ciclo celular. Puede utilizarse para alterar la expresión génica al interferir con la eliminación de grupos acetil de las histonas (las histonas desacetilasas, HDAC) y por lo tanto, alterar la capacidad de los factores de transcripción de ADN de acceder a las moléculas de ADN en la cromatina. De esta forma el TSA tiene potencial como fármaco antineoplásico. Se cree que su posible mecanismo de acción viene determinado por su capacidad para promover la expresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular y de la muerte celular programada, provocando inicialmente un bloqueo de las células tumorales en las fases G1 o G2+M del ciclo celular dependiendo de los modelos celulares y, posteriormente, la muerte de las células [12]. Afortunadamente y por razones no totalmente esclarecidas, las células tumorales son más sensibles a estos efectos de TSA y de otros iHDACs que las células normales del mismo tejido, por lo que la terapia epigenética con estos inhibidores es potencialmente interesante [13]. Tanto en nuestro laboratorio como en otros grupos, se ha demostrado que los iHDACs y en particular la TSA, inducen muerte celular en líneas celulares de diverso origen derivadas de tumores quimiorresistentes, lo que constituye un atractivo adicional para su utilización como

terapia alternativa para el tratamiento de tumores que no responden a los fármacos antineoplásicos convencionales [14].

1.4 MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR POR LOS INHIBIDORES DE DESACETILASAS DE HISTONAS

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los iHDACs tienen un efecto general sobre la transcripción al favorecer el estado de la cromatina abierta. Por tanto, el tratamiento con estos inhibidores conlleva a una activación transcripcional de entre el 5-10% de todos los genes, lo que favorece que puedan producirse efectos secundarios no deseados y respuestas al tratamiento muy diferentes dependiendo de los genes activados en cada tipo celular. Por este motivo, nuestro laboratorio ha estado intentando determinar los mecanismos moleculares de inducción de muerte celular por los iHDACs, con la esperanza de que, basados en estos mecanismos, podamos desarrollar activadores de vías de señalización celular que participen en el efecto de TSA pero que lo hagan independientemente del efecto transcripcional de la misma. En otras palabras, separar la inducción de la muerte celular que es el efecto interesante de los iHDACs de la activación transcripcional generalizada de los mismos.

Inicialmente, caracterizamos la muerte celular inducida por los iHDACs en diferentes modelos celulares de diferentes tipos de tumores, tales como los carcinomas de páncreas exocrino, colon, mama, próstata etc, así como de diferentes tipos de leucemia. Nuestros estudios mostraron que la inducción de muerte celular por los iHDACs no respondía a una apoptosis clásica dependiente de la actividad de caspasas, ya que en la práctica totalidad de los modelos ensayados, no era bloqueada por los inhibidores de las caspasas y sin embargo en todos los modelos analizados, el inhibidor de serin proteasas AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) bloqueaba la muerte inducida por iHDACs. [15]

Con el fin de determinar qué genes participaban en esa muerte celular programada caspasa independiente y serin proteasa dependiente, se realizaron en nuestro laboratorio estudios de expresión génica diferencial mediante el uso de microarrays de ADN. Los resultados obtenidos identificaron un grupo de menos de 20 genes cuya expresión resultaba modificada en todos los modelos celulares en los que el TSA inducía muerte celular y no en aquellos resistentes a la inducción de muerte por TSA. Adicionalmente, el tratamiento con AEBSF impedía la regulación de la expresión de estos

genes por TSA. Iniciamos en nuestro laboratorio una línea de investigación tendente a demostrar la relación causa-efecto entre los cambios de expresión de estos genes y la inducción de muerte celular por TSA. En trabajos anteriores en el laboratorio, así como en un trabajo de fin de grado del año anterior, se ha demostrado la participación de alguno de estos genes (XBP1, DUSP10 y otros) en la muerte celular inducida por TSA en líneas celulares de carcinoma de colon y páncreas, demostrando además que en esos modelos celulares, la inducción de estrés en el retículo endoplásmico por TSA parece ser importante para su efecto inductor de muerte celular.

En este trabajo de fin de grado, nos centraremos en los estudios de inducción de muerte mediada por TSA en cultivos primarios de glioblastoma.

1.5 TSA Y GLIOBLASTOMA

El glioblastoma multiforme constituye el tumor maligno primario del SNC más frecuente en los adultos, representando el 54% de todos los gliomas. Es el tumor cerebral más letal, con una supervivencia de un tercio de los pacientes al año y menos de un 5% a los 5 años. Desde hace décadas la radioterapia desempeña un papel clave en el tratamiento del glioblastoma multiforme, generalmente se emplea tras la cirugía para retrasar la progresión tumoral, alargar la supervivencia y mejorar los síntomas.

Sin embargo, los resultados del tratamiento convencional siguen siendo pobres, por lo que se han investigado múltiples vías alternativas para intentar mejorarlos, aunque sin éxito hasta el momento. El uso de Temozolamida junto con la radioterapia postoperatoria, es el tratamiento de elección en pacientes jóvenes y con buen estado general diagnosticados de glioblastoma multiforme. Es obvia la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra este tipo de tumores. En nuestro laboratorio colaboramos con otros grupos en la utilización de la nanotecnología como vehículo de nuevas terapias antitumorales. Una de nuestras líneas de investigación es la utilización de la terapia epigenética con iHDACs vehiculizada en nanopartículas, vehiculizando bien los iHDACs directamente o, bien activadores o inhibidores de los genes que median la inducción de muerte por estos compuestos. Para abordar esta línea es necesario determinar si los genes que median la inducción de muerte celular por los iHDACs en diversos modelos celulares, constituyen también posibles blancos terapéuticos en glioblastoma. Es además muy importante, demostrar si esto es así en modelos celulares lo más próximos posible al paciente, por ejemplo mediante la utilización de cultivos

primarios obtenidos a partir de muestras quirúrgicas de los pacientes. Estos cultivos primarios, nos permitirán testar *ex vivo* el efecto de los diferentes tratamientos, así como profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados.

1.6 RESULTADOS PRELIMINARES

Nuestros resultados preliminares indican que en algunas líneas celulares de glioblastoma multiforme, TSA induce muerte celular, aumentando el porcentaje de células en la fase sub G1 del ciclo celular, siendo este resultado similar a los encontrados en nuestro laboratorio anteriormente en otros modelos celulares de diferentes tipos de tumores sensibles a la inducción de muerte por TSA (figura 4).

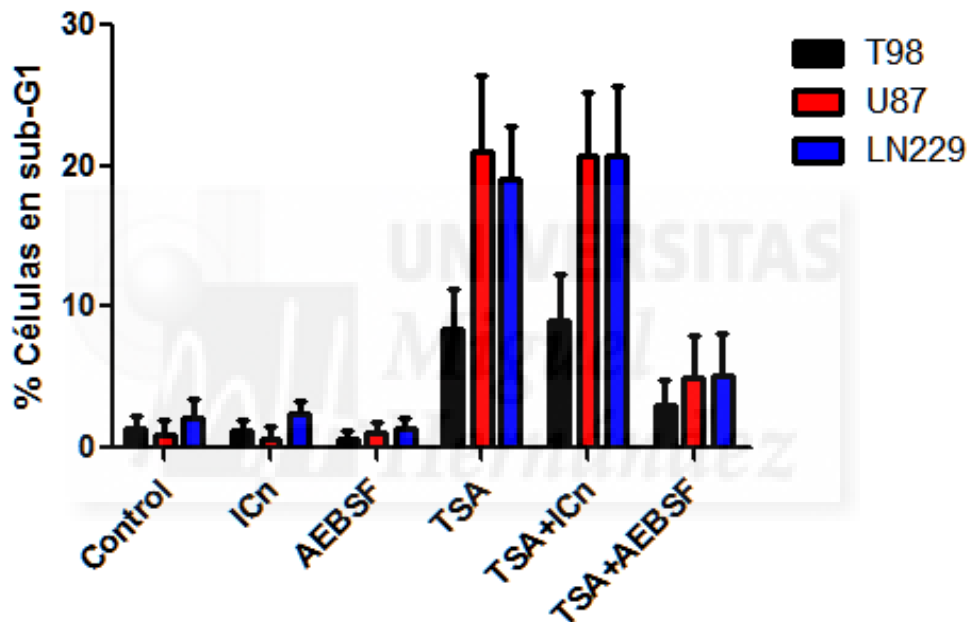


Figura 4: Representación en porcentaje de la muerte celular obtenida mediante ensayos de ciclo celular por citometría de flujo en presencia y/o ausencia de un inhibidor general de caspasas ICn (25 μ M) y en presencia y/o ausencia del inhibidor de serin-proteasas AEBSF (100 μ M).

Nuestros resultados mostraron igualmente que el mecanismo por el que TSA induce muerte celular no es dependiente de caspasas, puesto que el efecto se mantiene cuando tratamos los cultivos celulares con TSA en combinación con un inhibidor general de caspasas. Sin embargo, si tratamos las células con TSA en combinación con el inhibidor de serin proteasas AEBSF, el efecto de TSA disminuye significativamente, demostrando que se trata de un mecanismo dependiente de esta actividad enzimática.

Estos resultados preliminares que sugerían que TSA podría inducir muerte celular en líneas celulares de glioblastoma multiforme por un mecanismo similar al

utilizado por este compuesto en modelos celulares de carcinoma de páncreas y colon, nos lleva a plantear la siguiente hipótesis y los objetivos necesarios para determinar la validez o no de la misma.



2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Basándonos en datos previos obtenidos en nuestro laboratorio, que muestran que la muerte inducida por los inhibidores de desacetilasas de histonas es independiente de caspasas pero dependiente de las serín proteasas, y además, que este mecanismo de muerte está relacionado también con el estrés celular en el retículo endoplásmico en todos los modelos estudiados, postulamos la existencia de un mecanismo universal de inducción de muerte celular por los iHDACs y que dicho mecanismo esta también activo en cultivos celulares primarios de glioblastoma.

La universalidad de este mecanismo es importante desde un punto de vista terapéutico, ya que podría constituirse en un blanco terapéutico en tumores quimiorresistentes.

Con el fin de estudiar esta universalidad de los procesos de muerte celular inducidos por un inhibidor de deacetilasa de histonas, la tricostatina A (TSA) establecemos tres objetivos.

2.2 OBJETIVOS

1. Demostrar que el inhibidor de HDAC tricostatina A (TSA) puede inducir, de forma efectiva y selectiva, la detención del crecimiento tumoral en concentraciones muy bajas (rango nano-micromolar) en líneas celulares y cultivos primarios de glioblastoma.
2. Estudiar este mecanismo de muerte y comprobar que efectivamente está relacionado con el bloqueo de las serín-proteasas, y no de las caspasas, demostrando en parte la universalidad de estos mecanismos moleculares en los cultivos primarios de glioblastoma.
3. Determinar si los genes que median la inducción de muerte celular inducida por TSA en modelos celulares de colon y páncreas, tienen el mismo efecto en los cultivos primarios de glioblastoma tratados con TSA.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

Durante la realización de este trabajo, se utilizaron los cultivos primarios de glioblastoma multiforme HGUE GB 16, HGUE GB 18, HGUE GB 37, HGUE GB 39 y HGUE GB 42, , procedentes de cultivos celulares primarios de glioblastoma y las líneas celulares de glioblastoma establecidas U-87 y T-98.

Las líneas celulares U-87 y T-98 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal al 10% y con los antibióticos penicilina y estreptomicina al 5%. Los cultivos primarios se cultivaron con medio DMEM/F12 y los mismos suplementos mencionados anteriormente. Se cultivaron a una temperatura de 37°C y a una atmósfera de CO₂ al 5% en el incubador ESCO CelCulture CO₂.

3.2 TRANSFECCIÓN CON siRNA

Los siRNAs (*Small Interfering RNA*) son un tipo de ARN interferente bicatenario que presenta una longitud entre 20 a 25 nucleótidos. El silenciamiento de la expresión génica que proporciona este tipo de ARN es simple y rápido, y puede ser usado en un amplio rango de organismos. Presentan un mecanismo de regulación génica que limita los niveles de transcritos de dos formas: o bien inhibiendo la transcripción (TGS, *Transcriptional Gene Silencing*) o bien activando la degradación de secuencias específicas de RNA (PTGS, *Posttranscriptional Gene Silencing*) [16].

Con el fin de silenciar la expresión de una serie de genes de interés, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 200.000 células por pocillo en 2 ml de medio DMEM sin antibiótico. Se incubaron durante 18 horas a 37°C y atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo se prepararon los reactivos necesarios para la transfección: siRNA de los genes que se querían silenciar (descritos en la tabla 2); Lipofectamina RNAiMAX (Cat. 51985-034, Life Technologies), que se trata de una formulación lipídica catiónica específica de RNAi, diseñada especialmente para la entrada de siRNA y miRNA en distintas líneas celulares [17]; y el medio de transfección Opti-MEM (Cat. 31985-070, Life Technologies), que es una modificación del medio DNEM que contiene HEPES y bicarbonato sódico, y que está suplementado con

hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina, elementos traza y factores de crecimiento [18].

En cada experimento además del siRNA específico del gen a estudiar se empleó un siRNA inespecífico como control negativo del ensayo (Cat. 4390843, Life Technologies). Los volúmenes empleados por pocillo fueron los siguientes:

A: 2,5 μ l de siRNA (5 nmoles/ml) + 247,5 μ L del medio de transfección Opti-MEM

B: 5 μ l de Lipofectamina + 245 μ l del medio de transfección Opti-MEM

Las soluciones A y B se mantuvieron durante 5 minutos a temperatura ambiente por separado y después se mezclaron bien (añadiendo B sobre A lentamente) y se incubaron otros 20 minutos más de nuevo a temperatura ambiente. En cada pocillo se añadieron 500 μ l de la mezcla AB correspondiente, y 1500 μ l de medio DMEM sin antibióticos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C y atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de transfección y se substituyó por medio DMEM nuevo ahora ya con antibióticos. A partir de este momento se podía proceder al tratamiento con Tricostatina A (TSA).

3.3 TRATAMIENTO CON TSA

La concentración de TSA utilizada para las placas de 6 pocillos fue de 1 μ M. Para el estudio del ciclo celular se dejó actuar al TSA durante 24 horas con el fin de poder detectar la apoptosis que produce.

3.4 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Con el fin de determinar la distribución del contenido de DNA de las células, especialmente de células apoptóticas, se hizo uso de la citometría de flujo. La fragmentación del DNA internucleosomal es una característica que se da en la apoptosis. Debido a que los fragmentos de DNA de bajo peso molecular se extraen durante la tinción de células en soluciones acuosas, las células apoptóticas se pueden identificar en los histogramas de frecuencia de contenido de DNA como células con contenido de DNA fraccionado (sub-G1) [19].

Para la detección de dichas células, se recolectaron aproximadamente $1 \cdot 10^6$ células por cada experimento, se les retiró el medio que contenían y se trataron con 500 μ l de tripsina/EDTA 0.05% 5 minutos a 37°C. Una vez despegadas las células de las placas, se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las células se fijaron con etanol+ PBS 1x frío al 75% durante un mínimo de 30 minutos a -20°C. Una vez fijadas, las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm y tras eliminar el sobrenadante se resuspendieron en una mezcla que contenía: 2.5 ml RNasa A (libre de ADNasa) (1 mg/ml), 2.5 ml de yoduro de propidio (1 mg/ml) y 95 ml de PBS-Tritón al 0.5%. Las células se incubaron con esta mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo de incubación, se analizó la distribución de las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo.

La fluorescencia emitida por el yoduro de propidio, que se une de forma estequiométrica a los ácidos nucleicos, se determinó mediante el citómetro FACS CANTO II utilizando un filtro de paso de banda de 633 nm.

3.5 RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

3.5.1 Extracción del RNA total

La extracción del RNA total se realizó a partir de un máximo de $1 \cdot 10^7$ células mediante el *RNeasy Plus Mini Kit* (Cat. 74134, Qiagen). Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se trataban según el protocolo recomendado por el fabricante.

Una vez purificado el RNA, se determinó su concentración en las distintas muestras mediante el Nanodrop 1000 de *Thermo Scientific*. La concentración se obtuvo a partir de la absorbancia determinada a 260 nm y la pureza mediante la relación entre las absorbancias a 280 y 260 nm. Las muestras de RNA fueron conservadas a -80°C.

3.5.2 Reacción de retrotranscripción

El DNA complementario (cDNA) se obtuvo a partir de aproximadamente 1 μ g de ARN total, mediante el uso del kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Cat. 4368814, Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo siguiendo

el protocolo proporcionado por la casa comercial y usando hexámeros aleatorios como cebadores. El termociclador empleado fue el *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems). Las condiciones a las que se sometieron las muestras fueron las siguientes: 1 ciclo de unión de los cebadores al molde (25°C durante 10 minutos); 1 ciclo de transcripción inversa (37°C durante 2 horas); 1 ciclo de inactivación de la retrotranscriptasa y desnaturalización de cebadores (85°C durante 5 minutos); y por último para su conservación se mantuvieron a 4°C. Terminada la reacción se añadió 180 µL de agua libre de nucleasas de manera que la concentración final de cDNA fuese de aproximadamente 5 µg/ml. Las muestras de cDNA fueron conservadas a -20°C.

3.5.3 PCR cuantitativa a tiempo real

Los niveles del mRNA de los genes estudiados se detectaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real. La reacción se llevó a cabo empleando sondas TaqMan prediseñadas (*Assays-on-demand*, Applied Biosystems), recogidas en la [tabla 1](#). Como control interno de la reacción se utilizó una sonda para el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Hs01922876_u1, Applied Biosystems). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado en placas de 96 pocillos y siempre en modo *singleplex* (midiendo un/a solo/a gen/señal por pocillo). Como mezcla de reacción se utilizó *TaqMan Gene Expression MasterMix* (Cat. 4369016, Applied Biosystems), que contiene todos los componentes necesarios para realizar la reacción de PCR.

La reacción se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Para cada gen se realizó un control negativo NTP (Non Template Control) añadiendo agua libre de nucleasas en lugar de cDNA. Además cabe destacar que para cada condición que se quería analizar se hicieron tres réplicas biológicas (mismo tratamiento de forma independiente por triplicado) y sus respectivas tres réplicas técnicas (para la misma réplica biológica se realizó la reacción de PCR por triplicado). De esta forma para cada condición habría un $n = 9$.

El equipo empleado fue el 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), y las condiciones a las que se sometieron las muestras fueron las siguientes: 1 ciclo de eliminación de contaminación remanente por la activación de Uracil-N-Glicosilasa (UNG) (50°C durante 2 minutos); 1 ciclo de activación de la polimerasa e inactivación de UNG (95°C durante 10 minutos); 40 ciclos de desnaturalización (95°C durante 15

segundos) seguidos de la hibridación y extensión de las cadenas (60°C durante 1 minuto).

3.5.4 Análisis de los resultados

Tras finalizar la reacción, se obtuvieron los valores de Ct (*Cycle Threshold*) de cada una de las muestras y se procesaron según el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [20], usando como control interno el GAPDH y como control negativo muestras transfectadas con siRNA no específico. De esta forma se consiguió finalmente el nivel de expresión relativa de cada gen para la línea celular estudiada (RWP-1).

Con el fin de evaluar el nivel de significación de las diferencias entre los diferentes tratamientos de las muestras, se realizó la prueba U de Mann-Whitney, prueba no paramétrica que nos permite evaluar muestras independientes con un número bajo de réplicas, en nuestro caso $n = 9$ [21]. Este test estadístico se realizó mediante el uso del programa GraphPad Prism 5.

3.6 GENES A ESTUDIO

En la siguiente tabla, se indican los diferentes genes estudiados e información acerca de cada uno de ellos: nombre del gen (y otros alternativos), los nombres que recibe la proteína, función biológica que presenta, el siRNA utilizado para inhibir su expresión, la sonda que se utilizó en la PCRq a tiempo real para su detección, y el número de referencia de UniProt, donde se recoge más extensamente información relevante sobre la función de los genes.

NOMBRES DEL GEN	NOMBRES DE LA PROTEÍNA	FUNCIÓN BIOLÓGICA	ID siRNA	SONDA (PCRq)	UniProt
DUSP10, MPK5	<i>Dual specificity protein phosphatase 10; Mitogen-activated protein kinase phosphatase 5 (MPK-5)</i>	Fosfatasa involucrada en la inactivación de las MAPKs	s22145	Hs00200527_m1	Q9Y6W6
XBP1, TREB5	<i>X-box-binding protein 1 (XBP-1); Tax-responsive element-binding</i>	Factor de transcripción que actúa durante el estrés en el RE,	s14915	Hs03929085_g1 (Sin splicing XBP-1u)	P17861

	<i>protein 5 (TREB-5)</i>	regulando la UPR		Hs00964359_m1 (Con splicing XBP-1s)	
MBTPS2, S2P	<i>Membrane-bound transcription factor site-2 protease;</i> <i>Endopeptidase S2P;</i> <i>Sterol regulatory element-binding proteins intramembrane protease (SREBPs intramembrane protease)</i>	Metaloendopeptidasa que cataliza la activación proteolítica de ATF6 y SREBPs	s434	Hs00210639_m1	O43462

Tabla 1: Resumen de los diferentes genes a estudio donde se muestra información sobre su actividad y sobre los reactivos utilizados específicamente para cada uno de ellos.



4 RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL TSA EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOBLASTOMA

Una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio es el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas contra el glioblastoma multiforme. Para cumplir dicho objetivo hemos desarrollado técnicas que nos permiten obtener cultivos primarios de glioblastoma a partir de los aspirados quirúrgicos de los pacientes. Estos cultivos primarios pueden ser utilizados para testar *in vitro* y *ex vivo* la eficacia de los nuevos tratamientos. Las ventajas de este tipo de modelos son por un lado, una mayor proximidad al paciente en comparación con la utilización de líneas celulares establecidas y, por otro lado, el hecho de poder trabajar con un modelo no invasivo seguro para el paciente.

Dentro de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, nos interesa el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la nanotecnología y, en base a investigaciones previas de nuestro laboratorio, nos hemos planteado utilizar nanopartículas combinadas con la terapia epigenética con inhibidores de las desacetilasas de histonas. Este trabajo de fin de grado, aborda la caracterización del efecto de TSA en los cultivos primarios de glioblastoma multiforme, determinando si los mecanismos moleculares de inducción de muerte por TSA en este tipo de tumor, son similares a los observados en otros tumores sólidos previamente analizados en nuestro laboratorio.

En primer lugar, determinamos mediante ensayos de MTT, el efecto de TSA sobre la proliferación celular en dos líneas de glioblastoma multiforme en las que previamente, habíamos analizado el efecto de TSA sobre la distribución de las distintas fases del ciclo celular (figura 5) con el fin de determinar las dosis efectivas de TSA. Los resultados en la figura 5, muestran que la línea celular U87 es más sensible al tratamiento con TSA que la línea celular T-98.

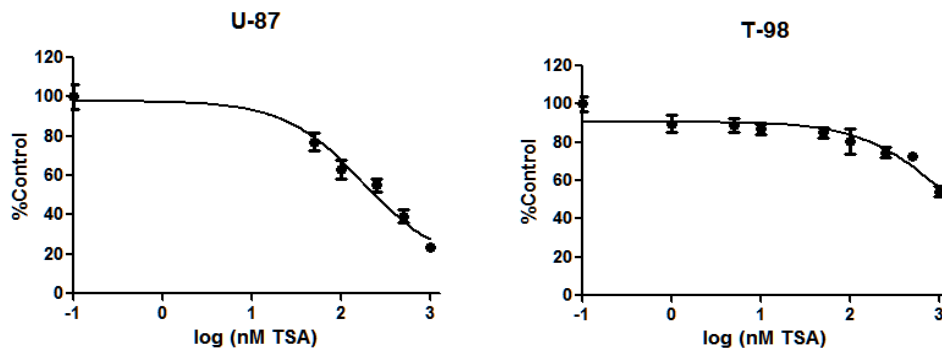


Figura 5: Resultados del experimento MTT realizado a las líneas celulares U-87 y T-98, donde se observa el aumento del porcentaje de muerte celular conforme aumenta la dosis del fármaco TSA.

Una vez comprobado el efecto de la tricostatina A en estas dos líneas celulares de glioblastoma mediante estudios de MTT, he realizado estudios de ciclo celular mediante citometría de flujo, comprobando que la TSA induce un aumento significativo de la fase sub G1 del ciclo celular en los cultivos primarios de glioblastoma estudiados, lo que significa que existe un aumento de la muerte celular en estas células cuando son tratadas con este fármaco, en comparación a los respectivos controles de cada línea celular (figura 6).

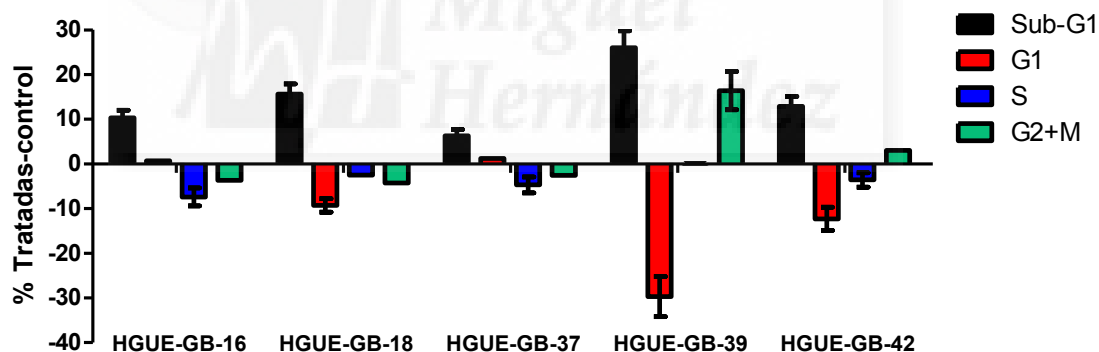


Figura 6: Resultados del estudio de citometría de flujo realizado en diferentes cultivos primarios de glioblastoma, donde se observa la diferencia en el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular obtenidas en las células tratadas una vez sustraídas los porcentajes presentes en cada una de las fases del ciclo celular en las células no tratadas. Se representa la media \pm SD.

En la figura 7 se muestran las distribuciones de las distintas fases del ciclo celular de un experimento representativo para la validación del tratamiento con el fármaco a estudio. En ausencia de TSA, el porcentaje de células en fase sub-G1 es muy pequeño y representa la muerte celular basal (A y C). Sin embargo, el tratamiento con 1 μ M de TSA durante 24 horas, induce un aumento significativo de dicho porcentaje (B y D). Los resultados indican que TSA induce muerte celular en los cultivos primarios HGUE GB 16

y HGUE BG 42. Resultados similares se obtuvieron en los cultivos HGUE GB 18, HGUE GB 37 y HGUE GB 39 (datos no representados).

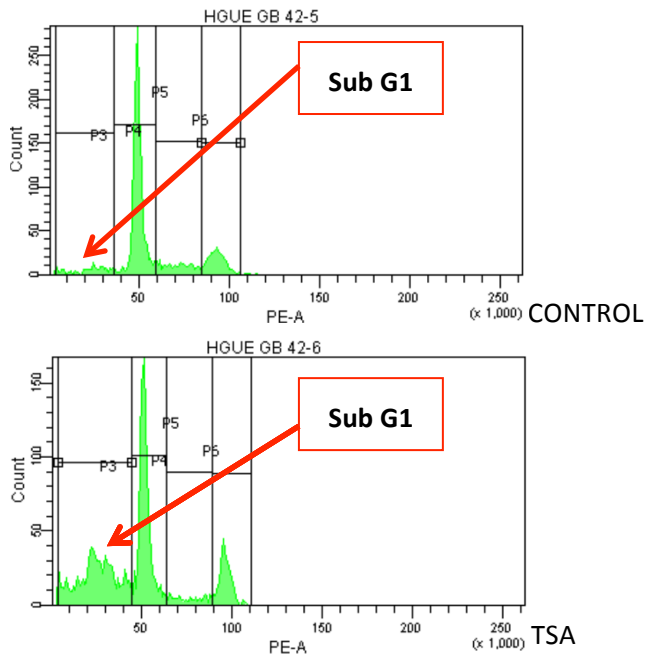


Figura 7: Experimento representativo de los resultados obtenidos por citometría de flujo realizado en la línea celular de glioblastoma HGUE-GB-42, donde se observa el aumento de células en la fase subG1 del ciclo celular que muestra los niveles de muerte celular, observando un mayor porcentaje de muerte en la segunda gráfica donde las células han sido tratadas con TSA 1 μ M, en comparación con la primera gráfica control.

4.2 PAPEL DE SERÍN PROTEASAS EN EL MECANISMO DE MUERTE INDUCIDA POR TSA

El segundo objetivo de esta línea de investigación es estudiar el mecanismo molecular asociado a la inducción de muerte celular mediada por TSA en cultivos primarios de glioblastoma multiforme y evaluar si, al igual que sucede en otros modelos celulares, este proceso es dependiente de la actividad de algunas serin proteasas. Para ello, partimos de cuatro cultivos primarios de glioblastoma multiforme: HGUE GB 18, HGUE GB 37, HGUE GB 39 y HGUE GB 42, y establecimos cuatro tratamientos distintos: control, TSA 1 μ M, AEBSF 100 μ M y TSA + AEBSF.

Nuestros resultados indicaron que, tal y como sucede en otros modelos celulares previamente analizados, el tratamiento con AEBSF induce una disminución significativa del efecto de TSA en todos los cultivos primarios analizados, puesto que en presencia de TSA+AEBSF, se observa un menor porcentaje de células en la fase sub G1 en comparación con el tratamiento únicamente con TSA (figura 8).

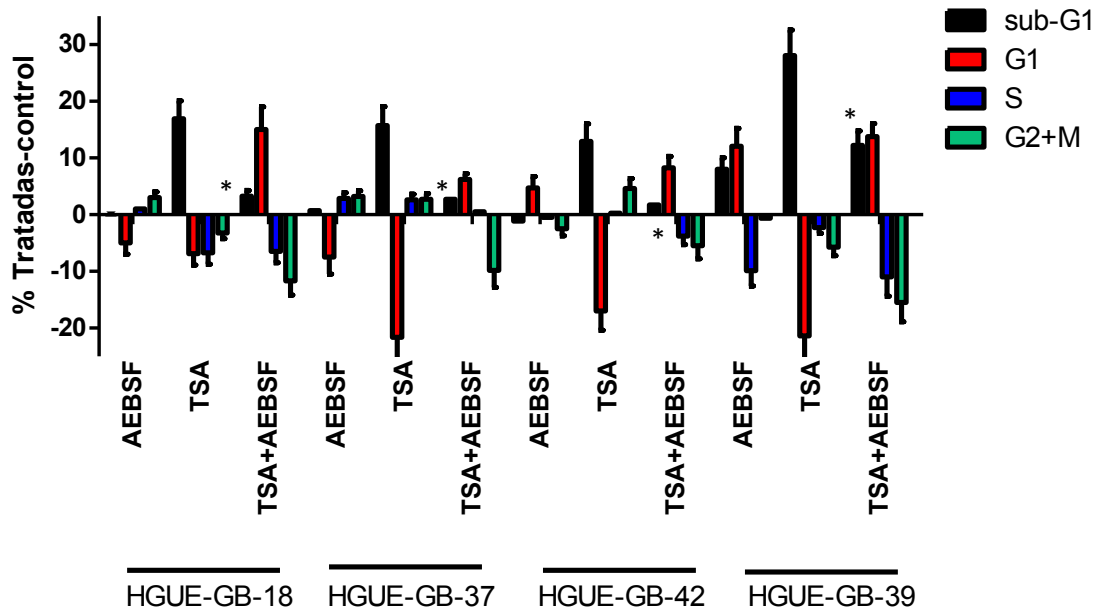


Figura 8: Resultados del estudio de citometría de flujo realizado en diferentes líneas celulares de glioblastoma, donde se observa la diferencia de viabilidad de células tratadas con TSA 1 μ M, AEBSF 1 μ M y TSA + AEBSF a lo largo de las fases del ciclo celular. Se representa el incremento en las diferentes fases del ciclo celular en las células tratadas con TSA tras la sustracción de los porcentajes en cada fase del ciclo celular presentes en las células no tratadas. *($P < 0,05$). Se representa la media \pm SD.

4.3 INHIBICIÓN MEDIANTE SIRNA DE LOS GENES DE INTERÉS Y SU EFECTO EN EL CICLO CELULAR

Tras demostrar que TSA induce muerte celular en los cultivos primarios de glioblastoma multiforme, y que el el tratamiento con AEBSF disminuye dicho efecto, nos planteamos analizar el papel que determinados genes que en otros modelos celulares parecen estar implicados en la respuesta a TSA, desempeñan en el efecto de TSA en cultivos primarios de glioblastoma multiforme. Para ello, transfectamos transitoriamente los cultivos primarios HGUE GB18 y HGUE GB42, con RNAs de interferencia (siRNA) específicos para esos genes.

El primer paso era comprobar que el procedimiento de la transfección no inducía *per se* muerte celular, por lo que en todas nuestras transfecciones se incluye un control con un siRNA inespecífico. Las células se transfectaron también con siRNAs específicos para los genes XBP1 o DUSP10, Tras 24 de transfección, las células se trataron con TSA 1 μ M durante 24 horas, analizando a continuación la distribución de las distintas fases del ciclo celular, mediante citometría de flujo. Para determinar si los siRNAs habían producido la disminución esperada de los niveles de mRNA de XBP1 y DUSP10, analizamos

en paralelo por RT-PCR los niveles de mRNA de estos genes en las células transfectadas con el siRNA inespecífico y en aquellas transfectadas con los siRNAs específicos.

Los resultados de esta primera transfección se muestran en la figura 9, en la que se representan los porcentajes en cada fase del ciclo celular obtenidos tras sustraer los porcentajes presentes en las células de los controles respectivos de las mismas células tratadas con TSA. Sin embargo, tal y como cabe esperar, cuando células transfectadas con el siRNA no específico se tratan con TSA 1 μ M, el porcentaje de células en fase sub G1 aumenta significativamente. La transfección transitoria con los siRNAs específicos para XBP1 y DUSP10, mostró una ligera disminución de la muerte celular inducida por TSA en las células del cultivo HGUE-GB-18 transfectadas tanto con siRNAs contra DUSP10 como contra XBP1. En las células tratadas con TSA del cultivo HGUE-GB-42 la inhibición de la muerte celular inducida por este iHDAC era más pronunciada que en el cultivo HGUE-GB-18 especialmente en el caso del XBP-1.

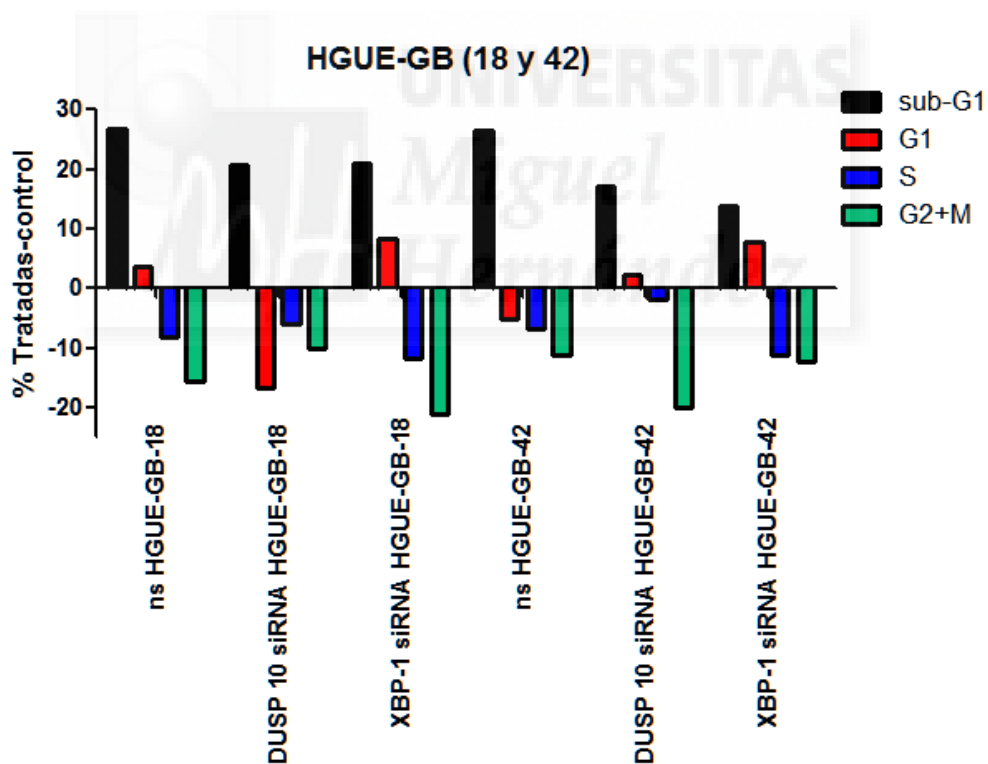


Figura 9: Experimento representativo de las primeras transfecciones con los siRNA. Se representan los porcentajes en cada fase del ciclo celular obtenidos tras sustraer los porcentajes en las células de los controles respectivos de las mismas células tratadas con TSA.

Al comprobar mediante RT-PCR en tiempo real, la eficacia de la transfección con los siRNAs específicos, determinando los niveles de expresión de los RNA mensajeros correspondientes, observamos que la transfección tuvo un efecto muy limitado en lo que a inhibición de la expresión se refiere, puesto que seguían observándose niveles de mRNA lo suficientemente significativos, con inhibiciones de la expresión de estos mRNAs en el entorno del 20-30%, claramente insuficiente para este tipo de experimentos de inhibición de la expresión génica, esta baja eficiencia de los siRNAs podría ser la causa del modesto efecto observado en los estudios de citometría de flujo. La mayor inhibición de la expresión se produjo en el cultivo HGUE GB42 transfectado con el siRNA específico de XBP1 (figura 10), que se corresponde con la condición a la que observábamos un efecto ligeramente mayor en los experimentos de citometría de flujo (figura 9).

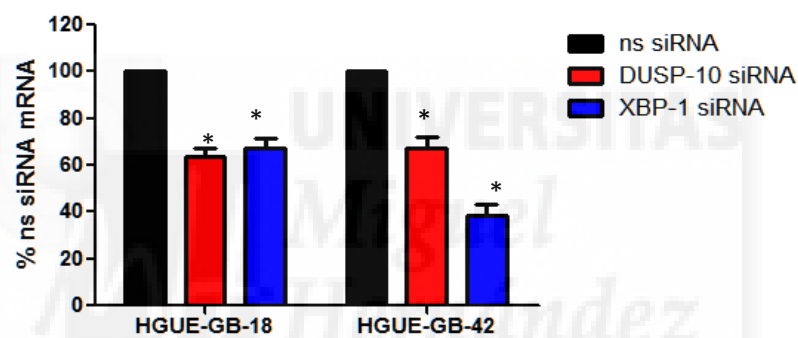


Figura 10: Niveles de expresión de los mRNAs de XBP-1 y DUSP-10 en los cultivos primarios HGUE-GB-18 y HGUE-GB-42 transfectados con siRNAs específicos para estos genes o con un siRNA inespecífico. *($P < 0,05$). Se representa la media \pm SD.

La escasa eficacia de la transfección, podría explicarse por el hecho de que en los cultivos primarios, este procedimiento es más complejo que en las líneas celulares inmortalizadas.

Dado que, el resultado más prometedor lo obtuvimos en las transfecciones con el siRNA específico de XBP1, repetimos los experimentos de transfección con este siRNA en los dos cultivos primarios previamente utilizados (GB18 y GB42). En este caso, la transfección funcionó mejor en GB18, observando una bajada mayor de la expresión del mRNA (figura 11). En los experimentos de citometría de flujo, observamos que en este mismo cultivo primario, se produce una disminución mayor en el porcentaje de células en la fase subG1 cuando éstas se transfectan con el siRNA específico de XBP1 (figura 11). Los

resultados de las figuras 11 y 12, sugieren que, efectivamente, este gen podría desempeñar un papel en los mecanismos moleculares asociados a la inducción de apoptosis mediada por TSA.

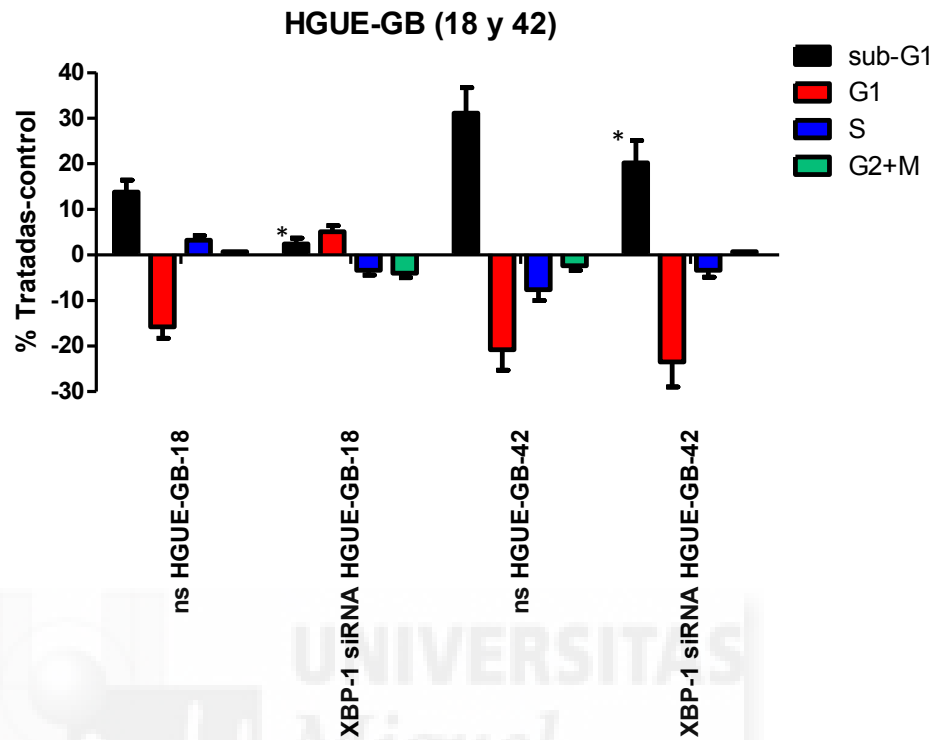


Figura 11: Experimento representativo de las primeras transfecciones con los siRNA. Se representan los porcentajes en cada fase del ciclo celular obtenidos tras sustraer los porcentajes en las células de los controles respectivos de las mismas células tratadas con TSA. *($P < 0,05$). Se representa la media \pm SD.

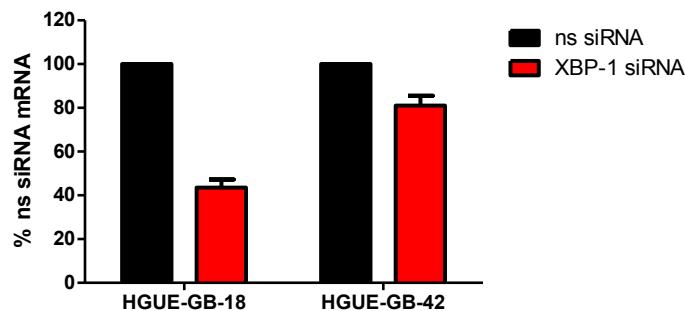


Figura 12: Niveles de expresión de los mRNAs de XBP-1 y DUSP-10 en los cultivos primarios HGUE-GB-18 y HGUE-GB-42 transfectados con siRNAs específicos para estos genes o un siRNA inespecífico. Se representa la media \pm SD.

Por último, se realizaron una serie de experimentos transfectando en este caso la línea celular de glioblastoma HGUE GB 42 durante periodos de 24 y 48 horas, con el fin de determinar si, tras 48 horas de transfección, se observa un mayor efecto. En este caso, las células se transfectaron con el siRNA específico para XBP1 o con el siRNA específico para el gen MBTPS 2 (Membrane-bound transcription factor site-2 protease). Los estudios de citometría de flujo, revelan una mayor disminución en el porcentaje de células en la fase subG1 cuando éstas se transfectan durante 48 horas (figura 13).

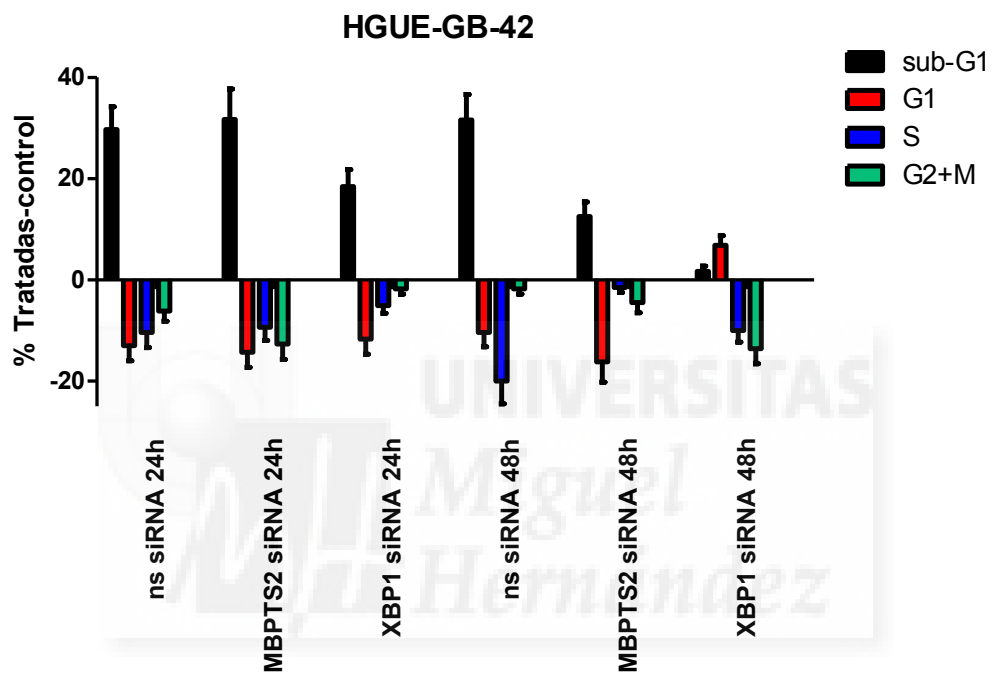


Figura 13: Experimento representativo de las transfecciones con los iRNAs. Se representan los porcentajes en cada fase del ciclo celular obtenidos tras sustraer los porcentajes en las células de los controles respectivos de las mismas células tratadas con TSA. Se representa la media \pm SD.

Mediante RT-PCR a tiempo real, observamos que efectivamente, tras 48 horas de transfección, se obtiene una inhibición mucho más elevada, de los niveles de expresión de los mRNAs correspondientes (figura 12).

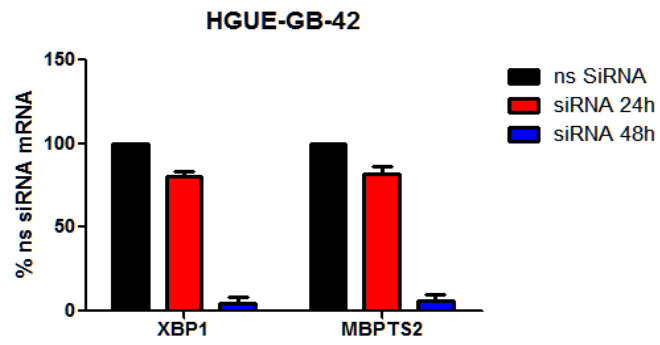


Figura 12: RT-PCR representativa de las transfecciones realizadas durante 24h o 48h. Se representa la media \pm SD.



5 DISCUSIÓN

El grupo de investigación donde he realizado mi TFG lleva años estudiando los inhibidores de las desacetilasas de histonas como posibles agentes terapéuticos en tumores quimiorresistentes [22]. Los resultados del grupo y de otros autores han demostrado que los inhibidores de desacetilasas de histonas eran capaces de inducir muerte celular en multitud de modelos celulares de diferentes tipos de tumores [23] y más interesadamente en algunos modelos celulares que presentaban resistencia a otros tratamientos [24].

El resultado de todos estos estudios mostraba que los iHDACs eran capaces de inducir muerte celular a dosis un orden de magnitud inferior en células tumorales que en células no tumorales del mismo tejido y que, incluso en el caso de algunos modelos celulares quimiorresistentes, las dosis necesarias para inducir la muerte celular eran inferiores a las necesarias para inducirla en el mismo modelo celular antes de adquirir dicha quimiorresistencia. Estos resultados sugerían que los iHDACs podían constituirse en un tratamiento efectivo en un número importante de tipos de cáncer.

Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos han mostrado efectividad únicamente en los linfomas de células T y no en los tumores sólidos ensayados [23]. Las razones de estos desalentadores resultados clínicos no se conocen totalmente, pero pueden estar relacionadas en parte con la inespecificidad de los efectos de los iHDACs. En efecto, si se realizan estudios de expresión génica diferencial genómicos o proteómicos comparando la expresión de los diferentes genes en presencia o ausencia de los diferentes iHDACs, se observa que hasta un 5-10 % de los genes estudiados modifican su expresión. La diversidad de estos genes es tal, que prácticamente todas las vías de transducción de señales, la regulación del ciclo celular o los mecanismos de reparación del DNA etc... están afectados. La razón de estos efectos tan generales en la expresión génica deriva por un lado de la importancia que el equilibrio entre la acetilación y la desacetilación de las histonas tiene en la remodelación de la cromatina y en la propia expresión génica [25] y, por otro lado, de la observación de diferentes efectos independientes de la regulación de la cromatina que los iHDACs tienen sobre la regulación por acetilación de diferentes proteínas muy importantes para las funciones celulares, por ejemplo TP53 y HSP90 [26] [27] .

Tanto nuestro grupo de investigación como otros, se plantearon a la luz de estos resultados si no sería más conveniente determinar las vías utilizadas por los iHDACs para inducir la muerte celular y generar fármacos que activaran estas vías

independientemente de los efectos generales sobre la expresión génica, como tratamiento en lugar de los propios iHDACs [28].

La mayoría de los grupos de investigación a diferencia del nuestro han seguido líneas de investigación que presentan algunos de los siguientes problemas:

1. Utilización de un único modelo celular o de un número limitado de los mismos.
2. Realización de análisis de expresión génica diferencial y dar por sentado que cualquier modificación en la expresión de genes que participan en algún tipo de muerte celular es significativo, sin demostrar la relación causa-efecto entre dicha variación y la inducción de muerte celular por los iHDACs.

Nuestro grupo siguió una línea de investigación diferente centrada en:

1. Caracterizar la muerte celular inducida por los iHDACs en diferentes modelos celulares de carcinoma humano y de ratón.
2. Buscar modelos celulares resistentes a la inducción de muerte celular inducida por los iHDACs.
3. Realizar estudios de expresión génica entre los diferentes modelos celulares y los modelos celulares resistentes.
4. Determinar la relación causa-efecto entre los cambios de expresión observados y la inducción de muerte por los iHDACs.

Gracias a estas aproximaciones experimentales, identificamos un conjunto de genes potencialmente relacionados con la inducción de muerte celular por los iHDACs. Este grupo de menos de 20 genes apuntaba a que la inducción de muerte celular por los iHDACs estaba estrechamente relacionada con la generación de estrés en el retículo endoplásmico y con la regulación de las MAPKs por algunas DUSPs (fosfatasas duales).

En un TFG anterior y utilizando técnicas de RNA de interferencia, se observó en modelos celulares de carcinoma de páncreas y colon que algunos de estos genes al ser inhibidos en su expresión bloqueaban significativamente la muerte inducida por TSA.

En el presente estudio, hemos continuado tratando de demostrar la relación causa-efecto entre algunos de estos genes y la muerte inducida por TSA. A diferencia del trabajo de fin de grado anterior, nuestro objetivo ha sido el glioblastoma multiforme, un tipo de tumor del SNC prácticamente intratable. También en este trabajo era diferente el

tipo de modelo celular utilizado, ya que el trabajo se ha realizado sobre cultivos primarios aislados de los aspirados quirúrgicos de los pacientes operados y no sobre modelos celulares ampliamente establecidos. Este cambio de modelo es importante porque estos cultivos son mucho más cercanos al paciente que las líneas celulares establecidas hace años y que han sido modificadas por las condiciones de cultivo generación a generación.

Nuestro trabajo se inscribe en una línea de investigación del laboratorio que tiene como objetivo la utilización de nanopartículas para vehicular diferentes fármacos capaces de actuar sobre los glioblastomas multiformes. En base a los resultados anteriores, un posible candidato para esta vehiculización serían los iHDACs o aún mejor, compuestos capaces de activar la misma vía de inducción de muerte celular que los iHDACs pero que no generaran sus efectos a nivel transcripcional. Para lograr este objetivo a largo plazo, necesitábamos realizar diferentes aproximaciones experimentales para determinar la viabilidad o no de esta aproximación.

Inicialmente necesitábamos saber si los iHDACs tenían efecto sobre la viabilidad y proliferación de las células de glioblastoma. Realizamos algunos experimentos de MTT utilizando dos líneas celulares de glioblastoma establecidas (U-87 y T-98) y en base a los resultados obtenidos en la figura 5 determinamos la concentración de 1 μ M de TSA como la que utilizaríamos a partir de ese momento en los experimentos de ciclo celular en los que basaríamos el trabajo más preciso del TFG. En segundo lugar, necesitábamos determinar si había muerte celular inducida por TSA en glioblastoma y si esta muerte celular seguía el patrón general de muerte inducida por los iHDACs. Teníamos evidencia de que los iHDACs inducían muerte celular en algunas líneas celulares de glioblastoma y que esta muerte celular no era inhibida por los inhibidores de caspasas pero sí por el inhibidor de serín-proteasas AEBSF, lo que sugería que al menos en líneas celulares de glioblastoma la hipótesis de un mecanismo general de inducción de muerte celular por los iHDACs podía ser cierta. Lo primero que necesitábamos probar es si la TSA era capaz de inducir muerte celular en nuestros cultivos primarios de glioblastoma, mucho más cercanos al paciente y por tanto más informativos que las líneas celulares. En la figura 6 mostramos el efecto que un tratamiento con TSA 1 μ M tiene sobre el ciclo celular de varios cultivos primarios de pacientes distintos (los cultivos 16, 18, 37, 39 y 42). Como puede observarse, el tratamiento con TSA provoca un aumento de la fase sub-G1 indicativa de muerte celular en los mismos. A continuación, era importante demostrar si esta muerte celular inducida en los cultivos primarios era serín proteasa dependiente tal y como hipotetizábamos. La figura 8 muestra que en efecto, el inhibidor de serín proteasas AEBSF era capaz de bloquear la muerte

inducida por TSA en estos cultivos celulares. Nuestros resultados indicaron que, tal y como sucede en otros modelos celulares previamente analizados, el tratamiento con AEBSF induce una disminución significativa del efecto de TSA en todos los cultivos primarios analizados.

Comenzamos entonces los experimentos que nos permitieran demostrar si los genes identificados en otros modelos celulares, desempeñaban un papel en la muerte inducida por TSA en los cultivos primarios de glioblastoma. Estos experimentos se mostraron especialmente difíciles de realizar por la resistencia de los cultivos primarios a la transfección de los RNAs de interferencia. Por ejemplo, como se muestra en la figura 9 con los cultivos primarios 18 y 42 transfectados con RNAs de interferencia para XBP1 y DUSP-10 y un RNA de interferencia inespecífico, apenas se observan cambios en la fase sub-G1 inducida por TSA en el cultivo 18, cuando se inhibe la expresión de XBP1 o DUSP10. En el cultivo 42, el bloqueo por XBP1 y DUSP-10 del efecto del TSA es algo mayor, pero tampoco muy significativo. Esta falta de efecto se debe a que los RNA de interferencia no han producido el efecto esperado sobre la expresión de los genes diana, tal y como se muestra en la figura 10 (RT-PCR). El problema de conseguir niveles de inhibición de la expresión de los genes diana similares a los obtenidos con los iRNAs en líneas celulares (hasta un 90 % de inhibición) ha constituido un serio problema para la realización de este TFG. Modificando distintos parámetros relacionados con la transfección, tales como el tiempo de transfección con los siRNAs antes de los experimentos con TSA, la relación entre el siRNA y el lípido catiónico utilizado como vehículo y, seleccionando aquellos cultivos primarios más sensibles a la transfección, hemos podido demostrar que XBP-1, DUSP-10 y MBPTS2 bloquean en parte la muerte celular inducida por TSA en cultivos primarios de glioblastoma multiforme, cuando su expresión es inhibida por siRNAs (figuras 10,11 y 12).

Los resultados obtenidos especialmente con XBP-1 y MBPTS2 apuntan a que también el estrés en el retículo endoplásmico juega un papel en la muerte celular inducida por TSA en los cultivos primarios de glioblastoma ya que se conoce que XBP1 es un factor de transcripción activado por IRE-1 mediante splicing cuando hay estrés en el retículo, por lo que XBP1 es parte de la respuesta de estrés del retículo endoplásmico (ER). Como resultado al estrés en el ER, GRP78 se libera de IRE1 para ayudar al plegamiento de la proteína [29] [30]. Por otra parte, MBPTS2 es una proteasa involucrada en la activación de los factores de transcripción de la familia ATF-6 en respuesta al estrés en el retículo. Por otro lado, la DUSP10 está implicada en la vía de las MAPK, ya que la activación de ésta vía está ligada a la expresión de estas proteínas. Las DUSPs están ligadas a regulación

mediante fosforilación a nivel post-transduccional,, lo que da lugar a alteraciones en la estabilidad de la proteína. Es interesante mencionar que se ha demostrado que DUSP10 se encuentra sobreexpresada en un número significativo de pacientes de GBM, lo cual puede ser de gran interés en investigaciones futuras [31].



6 CONCLUSIONES

1. Los niveles de iHDAC en concreto el TSA inhiben la proliferación celular e inducen muerte celular tanto en líneas celulares establecidas como en cultivos primarios de glioblastoma multiforme.

2. La muerte celular inducida por TSA en glioblastoma es caspasa independiente y serin proteasa dependiente al igual que sucede en otros modelos celulares de cáncer.

3. La inhibición de la expresión mediante siRNA de los genes XBP1, DUSP10 y MBTPSII bloquean parcialmente la muerte celular inducida por TSA en glioblastoma.

4. La participación de XBP1 y MBTPSII en la muerte inducida por TSA en glioblastoma sugiere que el estrés en el retículo endoplásmico participa en la inducción de muerte celular inducida por TSA.

5. La participación de la DUSP10 en la muerte inducida por TSA en glioblastoma sugiere que la vía de las MAP kinasas participa en la muerte celular inducida por estos compuestos.

6. los datos obtenidos en este TFG junto con datos anteriores del grupo abalan la existencia de un mecanismo universal de muerte celular inducida por TSA y/o otros inhibidores de iHDAC.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Terminar de validar el resto de los genes que participan en la inducción de muerte celular por los iHDACs en los modelos celulares de glioblastoma de los que disponemos. Utilizando los siRNAs.

Iniciar la inmovilización de los iHDACs en las nanopartículas e iniciar su validación como nueva estrategia terapéutica en los modelos celulares de glioblastoma y otros tipos de tumores.

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cancer.gov (s.f.). Obtenido de: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
- [2] Sociedad Española de Oncología Médica. Obtenido de: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
- [3] Cancer.gov (s.f.) Obtenido de: <http://www.cancer.org/espanol/servicios/comocomprendersudiagnostico/fragmentado/despues-del-diagnostico-una-guia-para-los-pacientes-y-sus-familias-common-cancer-treatments>
- [4] Obtenido de: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/what-is-chemotherapy/resistencia-a-la-quimioterapia.aspx>
- [5] Fukumoto I, Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Matsushita R, Kurozumi A, Kato M, Okato A, Okamoto Y, Seki N. (2015 Sep) The tumor-suppressive microRNA-23b/27b cluster regulates the MET oncogene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 49(3):1119-29.
- [6] Cirpan T, Aygul S, Terek MC, Kazandi M, Dikmen Y, Zekioglu O, Sagol S. (2007). MMAC tumor suppressor gene expression in ovarian endometriosis and ovarian adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*, 28(4):278-81.
- [7] Biocancer.com Obtenido de: <http://www.biocancer.com/journal/1321/21-protocologenes-y-oncogenes>
- [8] Genética y cáncer. Obtenido de: http://www.geneticaycancer.es/Area_molecular.html
- [9] Minjie S, Defei H, Zhimin H, Weiding W, Yuhua Z. (2015 Nov). Targeting pancreatic cancer cells by a novel hydroxamate-based histone deacetylase (HDAC) inhibitor ST-3595. *Tumour Biol*, 36(11):9015-22.
- [10] Shankar S, Srivastava RK. (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 615:261-98.
- [11] Elaut, G., Laus, G., Alexandre, E., Richert, L., Bachellier, P., Tourwé, D., Rogiers, V. and Vanhaecke, T. (2007, Apr). A metabolic screening study of trichostatin A (TSA) and TSA-like histone deacetylase inhibitors in rat and human primary hepatocyte cultures. *J Pharmacol Exp Ther*, 321(1), 400-408.
- [12] Yao J, Qian CJ, Ye B, Zhang X, Liang Y. (2012 Sep). ERK inhibition enhances TSA-induced gastric cancer cell apoptosis via NF- κ B-dependent and Notch-independent mechanism. *Life Sci*. 4;91(5-6):186-93.

- [13] Mousai M, Hosseini SM, Hajian M, Jafarpour F, Asgari V, Forouzanfar M, Nasr-Esfahani MH. (2015 Oct). Effect of epigenetic modification with trichostatin A and S-adenosylhomocysteine on developmental competence and POU5F1-EGFP expression of interspecies cloned embryos in dog. *Zygote*, 23(5):758-70.
- [14] Ruixia D, Zhe L, Xuedong H, Gongbi F, Ning A, Liping W. (2016) Trichostatin A potentiates genistein-induced apoptosis and reverses EMT in HEP2 cells. *Molecular Medicine Reports*, 13: 5045-5052.
- [15] ME Law, PE Corsino, SC Jahn, BJ Davis, S Chen, B Patel, K Pham, J Lu, B Sheppard, P Nørgaard, J Hong, P Higgins, J-S Kim, H Luesch, and BK Law. (2013 March 7) Glucocorticoids and histone deacetylase inhibitors cooperate to block the invasiveness of basal-like breast cancer cells through novel mechanisms. *Oncogene*, 32(10): 1316–1329.
- [16] (Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R., and Mukherjee, S. (2003, Dec). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657–685.)
- [17] <http://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/opti-mem.html>
- [18] <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/13778075>
- [19] Kajstura, M., Halicka, H.D., Pryjma, J. and Darzynkiewicz, Z. (2007, Mar). Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A*, 71(3), 125-131.
- [20] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001, Dec). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods*, 25, 402–408.
- [21] Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R. and Dobbie, Z. (2002, Jun). Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. *BioTechniques*, 32(6), 1372-4, 1376, 1378-9.
- [22] Sakamoto T, Kobayashi S, Yamada D, Nagano H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Noda T, Gotoh K, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Doki Y, Mori M. (2016 Jan 4) A Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *PLoS One.*, 11(1):e0145985.
- [23] Estefanía Carrasco-García, Miguel Saceda, and Isabel Martínez-Lacaci. (2014 Jun) Role of Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Glioblastoma. *Cells.*; 3(2): 199–235.
- [24] Trinidad Mata Balaguer, Angeles Gómez-Martínez, Pilar García-Morales, Javier Lacueva, Rafael Calpena, Lourdes Rocamora Reverte, Natividad Lopez Riquelme, Isabel

Martinez-Lacaci, José A Ferragut, and Miguel Saceda. (2012) Dual regulation of P-glycoprotein expression by Trichostatin A in cancer cell lines. *BMC Mol Biol.*; 13: 25.

[25] Jenny Y, Natasha K T, Haloom R, Xiao-Ming G, Mark Z, Xiao-Jun D, and Assam O. (2015 May) HDAC inhibition attenuates cardiac hypertrophy by acetylation and deacetylation of target genes. *Epigenetics* 10:5, 418-430.

[26] Jessica A H, Leah F and Brian B. (2014 Sep) Alternative approaches to Hsp90 modulation for the treatment of cancer. *Future Med Chem.* 6(14): 1587–1605.

[27] Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, Schrupp DS. (2002 Apr) Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst.* 3;94(7):504-13.

[28] Bossi P, Alfieri S. (2016 Jul) Investigational drugs for head and neck cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 25(7):797-810.

[29] Tongfu X, Liu Y, Cheng Y, Xiaoxia W, Ping H, Feng Z, Liyun Z, Mingliang Z, Weiping J, Xiangdong W, Yong L. (2014) The IRE1 α -XBP1 pathway regulates metabolic stress-induced compensatory proliferation of pancreatic β -cells. *Cell Research* 24:1137–1140.

[30] Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA (November 2009). "Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase-3 and -9 Activities". *J Membrane Biol* 232: 15-23. doi:[10.1007/s00232-009-9212-2]

[31] Angelica BS, Lauren A, Brent H, Cheri C, Nicholas A, Tariq B, Joseph G. (2014 Oct). mTORC2 modulates feedback regulation of p38 MAPK activity via DUSP10/MKP5 to confer differential responses to PP242 in glioblastoma. *Genes & Cancer*, Vol. 5 (11-12)

FIGURAS

[1] Representación de las células cancerosas que presentan alteraciones moleculares y desembocan en una pérdida del control de su proliferación. Obtenido de: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

[2] Regulación de la actividad transcripcional por modificación de histonas. Obtenido de: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol33_1_14/f0309114.jpg

[3] Representación molecular de la Tricostatina A. Obtenido de: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bb/Trichostatin_A_3D_ball.png

