



Universitat de Lleida

Caracterización de los efectos de los inhibidores de las histona desacetilasas en líneas celulares de glioma

Marta Cornago Protomártir

Dipòsit Legal: L.158-2015

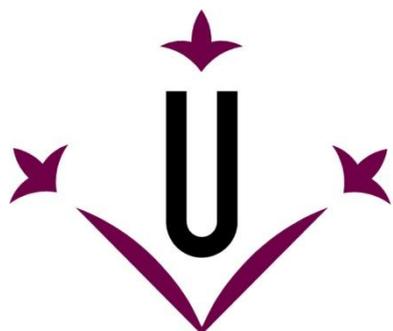
<http://hdl.handle.net/10803/285601>



Caracterización de los efectos de los inhibidores de las histona desacetilasas en líneas celulares de glioma està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2014, Marta Cornago Protomártir



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques

Caracterización de los Efectos de los Inhibidores de las Histona Desacetilasas en Líneas Celulares de Glioma

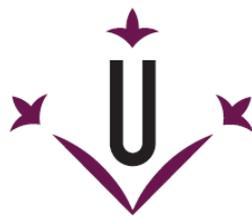
Marta Cornago Protomártir

Supervisores de Tesis:

Marta Llovera Tomàs

Daniel Sanchis Morales

Lleida, Septiembre 2014



Universitat de Lleida

Marta Llovera Tomas y **Daniel Sanchis Morales**, Doctores en Ciencias Biológicas, investigadores y profesores agregados del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universitat de Lleida, en calidad de codirectores de la presente tesis,

Manifiestan que,

La licenciada en Biotecnología por la Universitat de Lleida **Marta Cornago Protomártir**, ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión, en el grupo de Señalización Celular y Apoptosis del Departamento de Ciencias Médicas Básicas, el trabajo experimental que lleva por título “**Caracterización de los Efectos de los Inhibidores de las Histona Desacetilasas en Líneas Celulares de Glioma**”.

El trabajo reúne las condiciones científicas necesarias para ser defendido y juzgado por el Tribunal de Tesis correspondiente con el fin de optar al grado de **Doctor** por la Universitat de Lleida.

Y para que así conste y a los efectos oportunos firmamos el presente documento en Lleida a 8 de septiembre de 2014

Dra Marta Llovera Tomas

Dr. Daniel Sanchis Morales

A mis padres,

por el esfuerzo que les ha supuesto y el apoyo recibido

“Nada es fácil, el 99% de la gente no realiza sus sueños, ¿quién puede decir que tú no eres parte del 1%? Si no lo intentas, nunca lo sabrás”

Damian McGinty

AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

¡Increíble lo rápido que pasa el tiempo! Quién me iba a decir a mí la primera vez que llegué a Lleida que iban a pasar los años y yo seguiría viviendo aquí...y ya hace 8 años de eso, casi nada. Sin embargo ahora no me arrepiento de nada porque gracias a eso he conocido a personas increíbles.

En primer lugar quería agradecerle a Marta Llovera, está claro que sin ella nada de esto hubiera sido posible. Gracias por darme la oportunidad de quedarme y conseguir sacar esto adelante, sin tu ayuda no hubiera podido. Gracias por tu apoyo, en los buenos momentos y en los malos, no solo dentro del laboratorio sino también fuera de él, gracias por preocuparte por mí cuando estaba enferma o cuando he necesitado cualquier cosa. En resumen, puedo decirte que para mí has sido más que una jefa así que gracias por todo, te lo digo de corazón.

Gracias también al Dr Daniel Sanchis por las aportaciones que has ido haciendo a lo largo de estos años, gracias a ello, hemos conseguido sacar el trabajo adelante y creo que, con muy buenos resultados.

Por supuesto, agradecer a todas las personas que han ido formando parte del grupo y que han permitido que pudiera sacar el trabajo adelante: Maria, Nuria Vall·Llaura por ser la primera en enseñarme a trabajar, Carme Guerris por su apoyo técnico y entender que a la 13h ya me estaba muriendo de hambre para ir a comer, Junmei por su paciencia al intentar explicarme las cosas, Cristina Garcia por sus risas y su ganas de querer aprender, gracias también a Cristina Girón por toda tu ayuda tanto técnica como personal y por todos esos momentos divertidos que hemos vivido en este tiempo. Y por supuesto, muy en especial a Nati. Uf, podría dedicar un libro entero pero tengo que resumirlo en pocas líneas. Gracias por tu ayuda, tu apoyo, tus risas y llantos. Creo que las dos hemos hecho un buen equipo y en los malos momentos hemos sabido actuar con cabeza y no pensando en caliente, y gracias a ello podemos decir que nos hemos sacado un doctorado con optativas en psicología (tenía que ponerlo). Resumiendo, gracias por ser como eres y aunque la gente no lo vea así, no cambies nunca porque eres única y amigas así merece la pena tenerlas (puedes llorar al leerlo).

Un par de líneas para agradecer a mis compis del laboratorio de al lado: a Deepshika por tu ayuda; a Mireia por sus visitas al laboratorio, siempre me acordaré de esta frase: “me voy a mi chiringuito que aquí molesto”; a Charu por su paciencia a la hora de entenderme y

nuestros cafés compartidos; a Anna, la nueva incorporación que ha aportado momentos de risas en el laboratorio, gracias por tus ganas de querer ayudar siempre a la gente. Gracias a todas por hacer mi estancia más amena ;)

También agradecer a las personas que han estado a diario trabajando o compartiendo buenos momentos conmigo: Nuria, M^aAlba, Laura, Cristina, Andree, Marta, Miriam, Carlos, Berta, Gemma, Paolo y Judit Rivas, Elia, M^aJose; y a las nuevas incorporaciones por sus risas y buenos momentos, os deseo lo mejor en esta nueva etapa como doctorandos, Isidre, Tania, Pau, Maria y Gisel. Gracias a todos!

Por supuesto tengo que agradecer a mi chico, David, qué decirte! Gracias por estar siempre ahí e intentar comprenderme (aunque muchas veces ni yo me entendía). Siempre has sabido sacarme una sonrisa hasta en los malos momentos, que no han sido pocos, así que gracias por ser mi psicólogo durante este trayecto. Y decirte que aunque yo acabe aquí, nuestro camino juntos continúa así que no te sueltes de mi mano, que nos conocemos xD. Básicamente, gracias por ser tú, no cambies nunca!

Por último y no menos importante, gracias a mi familia, por el apoyo incondicional durante estos años, espero haberos adentrado un poco más en el mundo de la ciencia, ese gran desconocido para la mayoría de personas. Y en especial gracias a mis padres, por su apoyo incondicional, tanto moral como económico, gracias por ser como sois, de verdad, no podría soñar con unos padres mejor, sin vosotros, yo no hubiera llegado hasta aquí. También agradecer a mis amigas por su preocupación y por hacerme reír en todo momento, chicas sois únicas. La última persona me ha costado bastante introducirla, pero por petición expresa suya le voy a agradecer no sé el qué, a mi hermano. No es que haya aportado mucho pero él ha querido que le mencione, así que gracias por estar siempre ahí (eso sí, al otro lado del charco) y gracias por ser así, eres un hermano diez!

Resumiendo, gracias a todos por haber hecho realidad este sueño!

Moltes gràcies a tothom!!!

Thanks a lot to everyone!!!

See you soon!

CONTENIDO



Contenido

ABREVIATURAS	7
RESÚMENES	11
INTRODUCCIÓN	19
1. Tumores Cerebrales.....	21
1.1 Clasificación de los Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC).....	22
1.2 Glioblastoma Multiforme (GBM)	24
1.3 Glioma Stem Cells: células madre del tumor	25
2. Histona Desacetilasas (HDAC)	27
3. Estrategias Terapéuticas	30
3.1 El Agente alquilante Temozolomida (TMZ).....	30
3.2 Nuevas aproximaciones terapéuticas.....	34
4. Muerte Celular.....	43
4.1 Necrosis	43
4.2 Apoptosis	44
4.3 Autofagia	50
4.4 Catástrofe Mitótica	51
5. Mantenimiento de la Integridad del DNA	55
5.1 Puntos de control del ciclo celular.....	55
5.2 Daño al DNA	57
5.3 Sistemas de reparación de daño al DNA	71
6. Proteínas desreguladas en cáncer	75
6.1 Proteínas importantes en el punto de control G2/M.....	75
6.2 Survivina.....	77
6.3 TPX2.....	78
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	79
MATERIALES Y MÉTODOS	83
1. Cultivos Celulares	85
1.1 Líneas Celulares de glioma.....	85
1.2 Mantenimiento Líneas Celulares de Glioma	86
1.3 Cultivo y mantenimiento de células HEK 293T.....	87
1.4 Cultivo y Mantenimiento de Células en Cultivo Primario de Glioblastoma Humanos.....	88
1.5 Tratamientos farmacológicos de las células de glioma	89
1.6 Obtención de partículas lentivirales en HEK293	91
1.7 Transducción de las células de glioma	93

2. Biología Molecular	93
2.1 Materiales	93
2.2 Técnica General de Clonaje.....	94
2.3 Plásmidos utilizados para la obtención de los lentivirus	95
3. Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	96
3.1 Extracción RNA	96
3.2 Transcripción Reversa-PCR	96
3.3 Real Time PCR.....	97
4. Bioquímica	97
4.1 Western Blotting (WB).....	97
4.2 Análisis de la degradación del ADN por electroforesis- CHEF y LADDER...	102
5. Biología Celular.....	104
5.1 Inmunofluorescencia (IF)	104
5.2 Ensayos de Viabilidad	105
5.3 Ensayos de Clonogenicidad.....	108
5.4 Citometría de flujo (CMF).....	108
5.5 Ensayo Actividad Caspasa.....	111
6 Herramientas Bioinformáticas	111
6.1 pDRAW32	111
6.2 Image J.....	112
RESULTADOS	113
1. Sensibilidad de las células de glioma a los inhibidores de las HDAC: VPA y SAHA	117
1.1 Ensayo de Viabilidad basado en las sales WST-1	117
1.2 Ensayo de Viabilidad celular mediante tinción con Azul de Tripano	119
2. Determinación del efecto de los inhibidores de las HDAC en la proliferación celular de las tres líneas de glioma.....	121
3. Análisis de la clonogenicidad de las células de glioma tras el tratamiento con los inhibidores de las HDAC.....	123
4. Caracterización de los efectos de los HDACi en la morfología nuclear	124
5. Determinación de la implicación de la vía apoptótica mitocondrial: análisis y expresión de la activación de las caspasas -3 y -9	126
5.1 Estudio de la implicación de las caspasas en la muerte inducida por los tratamientos con los HDACi	128
6. Estudio de los efectos de los inhibidores de las HDAC en la integridad del DNA genómico	131
7. Determinación del daño al DNA inducido por SAHA y el agente terapéutico Temozolomida (TMZ).....	136
7.1 Implicación de las caspasas y la vía intrínseca de la apoptosis en la formación de DSB	139

7.2	Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en la producción de daño al DNA inducido por los HDACi	140
8.	Análisis de la progresión del ciclo celular tras los tratamientos con los inhibidores de las HDAC	146
8.1	Expresión de proteínas quinasas involucradas en el punto de control G2 del ciclo celular.....	148
9.	Caracterización del tipo de muerte celular inducida por los HDACi.....	153
10.	Análisis de los efectos de SAHA en cultivos primarios de GBM humanos.....	158
11.	Sensibilidad de las células de glioma al ligando de receptores de muerte TRAIL	163
12.	Expresión de los receptores de TRAIL.....	165
13.	Análisis de la expresión de los componentes de la vía apoptótica	167
13.1	Caracterización de la expresión de las caspasas en células de glioma	167
13.2	Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en células de glioma	168
13.3	Análisis de la activación de caspasas	170
13.4	Caracterización del efecto de los inhibidores de las HDAC en las principales caspasas implicadas en la apoptosis	173
13.5	Análisis del efecto de los inhibidores de las HDAC en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2	174
14.	Sensibilización de las células U251-MG a la muerte por TRAIL.....	175
	DISCUSIÓN.....	179
1.	Los inhibidores de las HDAC reducen la viabilidad, la capacidad proliferativa y la clonogenicidad de las células de glioma in vitro	183
2.	Los HDACi promueven condensación nuclear y la activación de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis	184
3.	Los HDACi promueven la fragmentación del DNA en las líneas de glioma, dependiente de la activación de caspasas y la nucleasa CAD	185
4.	La inhibición de las HDAC en células de glioma provoca daño al DNA, en cierta medida como consecuencia de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	187
5.	Los HDACi afectan a la progresión del ciclo celular y disminuyen la expresión de proteínas involucradas en el punto de control G2: Wee1 y Chk1	190
6.	Los HDACi causan muerte de las células de glioma por catástrofe mitótica.....	193
7.	Los cultivos primarios de GBM tratados con SAHA se comportan de forma similar a las líneas celulares de glioma testadas.....	196
8.	Los HDACi sensibilizan a TRAIL a dos de las líneas celulares de glioma estudiadas pero son ineficaces para las células U251-MG	198
	CONCLUSIONES	203
	BIBLIOGRAFÍA.....	207
	ANEXO.....	225

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

Bcl-X	Bcl-2-like 1 isoform 1	LMWF	Low Mol. Weight
Bcl-2	B-cell lymphoma 2		Fragmentation
BSA	Albúmina Sérica Bovina	MC	Catástrofe Mitótica
CAD	Caspase-activated desoxyribonuclease	MMR	Missmatch Repair System
Cdc2	Cell division control protein 2 homolog	MGMT	O ⁶ -metilguanina-DNA- metiltransferasa
Cdk1	Cell dependent kinase 1	NaBu	Butirato de Sodio
Chk1	Cell cycle checkpoint kinase 1	NAC	N-acetil-L-cisteína
DcR	Decoy Receptor	NHEJ	Non-Homologous end joining
DDR	DNA Damage Response	PBS	Solución salina con tampon fosfato
DNP	α -Dinitrophenyl	PI	Ioduro de Propidio
DR	Death Receptor	QV-OPh	Inhibidor Universal de Caspasas
DSB	Double Strand Break	RAD	DNA Repair Protein
FDA	Food and Drug Administration	ROS	Reactive Oxygen Species
GBM	Glioblastoma Multiforme	SAHA	Ácido Suberoyanilide Hidroxámico
GSC	Glioma Stem Cell	shRNA	small hairpin RNA
GSH	Glutati3n, γ - Glutamilcisteinilglicina	SNC	Sistema Nervioso Central
H2AX	Histone-2-AX	SSB	Single Strand Break
HDAC	Histona Desacetilasa	STS	Estaurosporina
HDACi	Inhibidor de las HDAC	TBP-2	Thioredoxin Binding protein-2
HMWF	High Mol. Weight Fragmentation	TMZ	Temozolomida
HR	Recombinaci3n Hom3loga	TNF	Tumor Necrosis Factor
		TRAIL	TNF-related Apoptosis inducing Ligand
		TRX-1	Thioredoxin-1
		TSA	Tricostatina
		VPA	Ácido Valproico
		WST-1	Sales de Tetrazolium

RESÚMENEŞ

RESUMEN

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es el tipo de tumor cerebral más agresivo y con peor pronóstico de todos, debido a su capacidad de infiltración difusa y su extrema resistencia a las terapias convencionales de radio/quimioterapia. Las Histona Desacetilasas (HDAC) son enzimas que regulan la expresión génica mediante el cambio en el estado de acetilación de diversas proteínas. Muchos tipos de cánceres se asocian a una actividad anormal de las HDAC, lo que resulta en alteraciones en la expresión génica que promueven el desarrollo del tumor. La inhibición de las HDAC con fármacos específicos (HDACi) se ha convertido en una estrategia prometedora para sensibilizar distintos tipos de células tumorales a las terapias anti-tumorales. Los efectos de estos fármacos son la inhibición del crecimiento, la diferenciación y la muerte de las células tumorales, sin afectar a las células normales. A lo largo de este proyecto, se ha trabajado con dos HDACi que están siendo utilizados en ensayos clínicos para el tratamiento del GBM, el ácido suberanilodihidroxámico (SAHA) y el ácido valproico (VPA). Se ha caracterizado el efecto de estos fármacos sobre el crecimiento y la viabilidad de células de glioma *in vitro* y se han determinado los cambios moleculares conducentes a la muerte celular. Nuestros resultados demuestran que el uso de ambos HDACi reduce la viabilidad, la proliferación y la clonogenicidad de las células de glioma. Además provocan múltiples efectos, como la inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inducción de daño en el DNA genómico y su fragmentación, y la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis. Sin embargo, la muerte de las células de glioma no es prevenida por la adición del inhibidor universal de caspasas Q-VD-OPh. Es interesante observar que los HDACi disminuyen la expresión de quinasas involucradas en el punto de control G2 -Wee1 y Chk1, ocasionando alteraciones en la progresión del ciclo celular y la entrada en mitosis de células con el DNA dañado. Además, los HDACi son capaces de reducir la expresión de proteínas importantes en reparación del DNA (Rad51), formación del huso mitótico (TPX2) y segregación de los cromosomas (survivina) en células de glioma y cultivos primarios de glioblastoma multiforme humano. Estos resultados junto con la observación de que los HDACi provocan la activación de caspasa-2, sugiere que estos

fármacos provocan la muerte de las células de glioma a través de apoptosis mediada por catástrofe mitótica. Por otro lado, los resultados demuestran que los HDACi tienen limitada capacidad de aumentar la sensibilidad de las células de glioma a la muerte inducida por el ligando de receptores de muerte TRAIL, puesto que las células de glioma presentan mecanismos de resistencia a la muerte debido a la alteración de la expresión de proteínas anti y/o pro-apoptóticas. En especial, las células U251-MG presentan mayor resistencia a TRAIL debido a su baja expresión de caspasa-8, interfiriendo en la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. En resumen, nuestros resultados sugieren que la adición de TRAIL no es una buena estrategia terapéutica para GBM, ni solo ni combinado con los HDACi. Sin embargo, los HDACi por sí solos causan múltiples cambios que conducen a la muerte de las células tumorales y, por lo tanto, presentan potencial terapéutico para el tratamiento del GBM. Además el conocimiento de las alteraciones causadas por los HDACi puede contribuir al desarrollo de nuevos fármacos más específicos para el tratamiento del GBM.

RESUM

El glioblastoma multiforme (GBM) és el tipus de tumor cerebral més agressiu i amb pitjor pronòstic de tots, per la seva capacitat d'infiltració difusa i la seva extrema resistència a les teràpies convencionals de ràdio/quimioteràpia. Les Histona desacetilases (HDAC) són enzims que regulen l'expressió gènica mitjançant el canvi en l'estat d'acetilació de diverses proteïnes. Molts tipus de càncers s'associen a una activitat anormal de les HDAC, el que dona lloc a alteracions en l'expressió gènica que promouen el desenvolupament del tumor. La inhibició de les HDAC amb fàrmacs específics (HDACi) s'ha convertit en una estratègia prometedora per tal de sensibilitzar diferents tipus de cèl·lules tumorals a les teràpies anti-tumorals. Els efectes d'aquests fàrmacs són la inhibició del creixement, la diferenciació i la mort de les cèl·lules tumorals, sense afectar les cèl·lules normals. Al llarg d'aquest projecte, s'ha treballat amb dos HDACi que són utilitzats en assajos clínics per al tractament del GBM, l'àcid suberanilodihidroxàmic (SAHA) i l'àcid valproic (VPA). S'ha caracteritzat l'efecte d'aquests fàrmacs sobre el creixement i la viabilitat de cèl·lules de glioma *in vitro* i s'han determinat els canvis moleculars que condueixen a la mort cel·lular. Els nostres resultats demostren que l'ús de tots dos HDACi redueix la viabilitat, la proliferació i la clonogenicidad de les cèl·lules de glioma. A més provoquen múltiples efectes, com la inducció de la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), la inducció de dany al DNA i la seva fragmentació, i l'activació de la via mitocondrial de l'apoptosi. No obstant això, la mort de les cèl·lules de glioma no és previnguda per l'addició de l'inhibidor universal de caspases Q-VD-OPh. És interessant observar que els HDACi disminueixen l'expressió de quinases involucrades en el punt de control G2 -Wee1 i Chk1, ocasionant alteracions en la progressió del cicle cel·lular i l'entrada en mitosi de cèl·lules amb dany al DNA. A més, els HDACi són capaços de reduir l'expressió de proteïnes importants en reparació del DNA (Rad51), en la formació del fus mitòtic (TPX2) i en la segregació dels cromosomes (survivina) en cèl·lules de glioma i cultius primaris de glioblastoma multiforme humà. Aquests resultats juntament amb l'observació que els HDACi provoquen l'activació de caspasa-2, suggereix que aquests fàrmacs provoquen la mort de les cèl·lules de glioma a través d'apoptosi causada per la

catàstrofe mitòtica. D'altra banda, els resultats demostren que els HDACi tenen limitada capacitat d'augmentar la sensibilitat de les cèl·lules de glioma a la mort induïda pel lligand de receptors de mort TRAIL, ja que les cèl·lules de glioma presenten mecanismes de resistència a la mort a causa de l'alteració de l'expressió de proteïnes anti i/o pro-apoptòtiques. En especial, les cèl·lules U251-MG presenten major resistència a TRAIL degut a una baixa expressió de caspasa-8, que impedeix l'activació de la via extrínseca de l'apoptosi. En resum, els nostres resultats suggereixen que l'addició de TRAIL no és una bona estratègia terapèutica per GBM, ni sol ni combinat amb els HDACi. No obstant això, els HDACi per si sols causen múltiples canvis que condueixen a la mort de les cèl·lules tumorals i, per tant, presenten potencial terapèutic per al tractament del GBM. A més el coneixement de les alteracions causades pels HDACi pot contribuir al desenvolupament de nous fàrmacs més específics per al tractament del GBM.

ABSTRACT

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most aggressive type of brain tumor with the worst prognosis due to its ability to infiltrate into surrounding tissue and its resistance to conventional radio and chemotherapies. Histone deacetylases (HDAC) are enzymes that regulate gene expression by modifying the acetylation status of several proteins. Many types of cancers are associated with abnormal HDAC activity, which results in the alteration of gene expression and promotes tumor development. HDAC inhibitors (HDACi) have become a promising strategy to sensitize cancer cells to anti-tumoral therapies. The effects of these drugs on cancer cells are inhibition of cell growth, induction of cell differentiation and cell death without affecting normal cells. Throughout this project, we worked with two HDACi that are being used in clinical trials for the treatment of GBM, suberanylodihydroxamic acid (SAHA) and valproic acid (VPA). We characterized the effect of these drugs on glioma cell growth and viability *in vitro* and we have identified the molecular changes leading to cell death. Our results demonstrate that the addition of both HDACi reduces glioma cell viability, proliferation and clonogenicity. They have multiple effects including the induction of reactive oxygen species (ROS) production, genomic DNA damage and fragmentation, and activation of the apoptotic mitochondrial pathway. However, glioma cells death is not prevented by a pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh. Interestingly, HDACi decreased the expression of G2 checkpoint kinases –Wee1 and Chk1. Therefore, they alter cell cycle progression and cell entry into mitosis with damaged DNA. Furthermore, HDACi decreased the expression of proteins involved in DNA repair (Rad51), mitotic spindle formation (TPX2) and chromosome segregation (survivin) in glioma cells and primary cultures of human GBM. These results together with the observation that HDACi cause caspase-2 activation, suggest that these drugs cause glioma cell death through apoptosis mediated by mitotic catastrophe. Furthermore, we show that HDACi have limited capability to sensitize glioma cells to the death ligand TRAIL because glioma cells exhibit resistance mechanisms due to the alteration of the expression pattern of anti- and/or pro-apoptotic proteins. In particular, U251-MG cells are more resistant to TRAIL because of low expression of caspase-8 which hampers the activation of the extrinsic

pathway of apoptosis. In summary, our results suggest that the addition of TRAIL is not a good therapeutic strategy for GBM, either alone or combined with HDACi. However, HDACi treatment cause multiple changes driving tumor cells to death, therefore, they may have therapeutic potential for the treatment of GBM. Defining the alterations caused by HDACi may also contribute to the development of more specific drugs for GBM treatment.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Tumores Cerebrales

Un tumor cerebral es un grupo de células anormales que crecen en el cerebro o alrededor de él. Los tumores pueden producir daños de forma directa o indirecta, es decir, destruyendo directamente las células sanas del cerebro, o bien, invadiendo otras partes del cerebro que acabarán dañando estas células sanas.

Podemos dividir los tumores cerebrales en dos tipos: primarios o metastásicos. Los primeros, son los que se originan en el propio cerebro, mientras que los otros aparecen cuando las células cancerígenas de otras partes del cuerpo –pulmón, pecho, etc- acaban llegando al cerebro.

Los tumores pueden desarrollarse a cualquier edad, aunque muchos tumores específicos tienen un grupo de edad particular en el cual son más comunes. Los tumores cerebrales malignos son la primera causa de muerte en niños y la tercera de muerte por cáncer en jóvenes de entre 15 y 34 años. Se desconoce la causa de la formación de tumores cerebrales primarios; los factores ambientales y genéticos podrían estar implicados en algunos casos, aunque parece que ocurran más bien al azar. Los síntomas de un tumor cerebral son variados, incluyendo dolor de cabeza, náuseas, vómitos, convulsiones, cambios en la conducta, pérdida de la memoria y problemas de la vista o el oído; entre otros.

En España, según datos de los registros poblacionales de cáncer, obtenidos de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), que abarcan a un 25% aproximadamente de la población española, la incidencia de tumores cerebrales primarios es de 8.73 de cada 100.000 individuos por año en varones y 5.41 en mujeres; mostrando un cierto predominio de los tumores benignos en mujeres, mientras que las cifras globales de los malignos e incrementan en varones.

Los tratamientos actuales combinan la resección quirúrgica del tumor con sesiones de radioterapia y quimioterapia que pueden proporcionar un control inicial del tumor. Sin embargo, a pesar del constante desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas

intensivas y cuidados paliativos, la supervivencia media de pacientes que padecen este tipo de cáncer se ha mantenido en 12 meses durante las últimas décadas.

1.1 Clasificación de los Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC)

El sistema más utilizado para clasificar los distintos tumores es el método del “*World Health Organization*” (WHO). Está basado en el consenso internacional de un grupo formado por 25 patólogos y genetistas, así como en la contribución de más de 70 expertos internacionales. El método WHO es una combinación de criterios usados para predecir la respuesta y resultados de una determinada terapia. Estos criterios incluyen datos clínicos, como la edad del paciente, rendimiento neurológico y localización del tumor; características radiológicas; grado de resección quirúrgica; índices de proliferación; y alteraciones genéticas. Para cada tumor, la combinación de estos parámetros contribuye a una estimación global del pronóstico (Louis *et al.*, 2007).

Los gliomas comunes que afectan a los hemisferios cerebrales de un adulto se consideran gliomas “difusos” debido a su tendencia a infiltrarse, de forma temprana y extensa, a través del cerebro. Éstos se clasifican histológicamente, inmunohistoquímicamente y/o ultraestructuralmente como astrocitomas, oligodendrogliomas, o tumores con características tanto de astrocitos como de oligodendrocitos, conocidos como oligoastrocitomas (Furnari *et al.*, 2007).

Todos ellos se clasifican de acuerdo al método WHO, en una escala del I-IV según el grado de malignidad y de las alteraciones genéticas que presentan. En concreto los tumores astrocíticos se clasifican de la siguiente forma (Figura 1):

- **Grado I (astrocitoma pilocítico)**, son aquellos biológicamente benignos que pueden ser curados mediante una resección quirúrgica. Es un tumor de crecimiento lento, poco frecuente, bien localizado, que se presenta mayoritariamente en niños y adultos jóvenes. Representan un 10% de los astrocitomas cerebrales y un 85% de los cerebelares.
- **Grado II (astrocitoma difuso)**, son los gliomas de bajo grado más frecuentes, y pueden tener largos procesos clínicos, pero su temprana infiltración en los alrededores del cerebro los hace incurables mediante cirugía. Crecen lentamente, se presentan en adultos jóvenes y tienden a proliferar hasta astrocitoma

anaplásico y finalmente a glioblastoma. Representan alrededor del 35% de los tumores astrocitarios.

- **Grado III (astrocitoma anaplásico)**, se caracteriza histológicamente por atipia nuclear, aumento de la celularidad y una actividad proliferativa significativa. Constituyen el 4% de todos los tumores primarios del SNC. La mayoría de los casos aparecen en la edad adulta, generalmente diagnosticados entre los 45 y 69 años. Tiene una tendencia importante a evolucionar a glioblastoma con una mediana de tiempo de 2 años.
- **Grado IV (glioblastoma multiforme)**, son tumores que provienen de una progresión de un astrocitoma anaplásico o, más frecuentemente de una mutación *de novo* sin la manifestación de un precursor maligno. Presentan características más avanzadas de tumorigenicidad, incluyendo proliferación vascular y necrosis del tejido. Debido a su resistencia a la radio/quimioterapia, generalmente, son letales dentro de un período máximo de 12 meses.

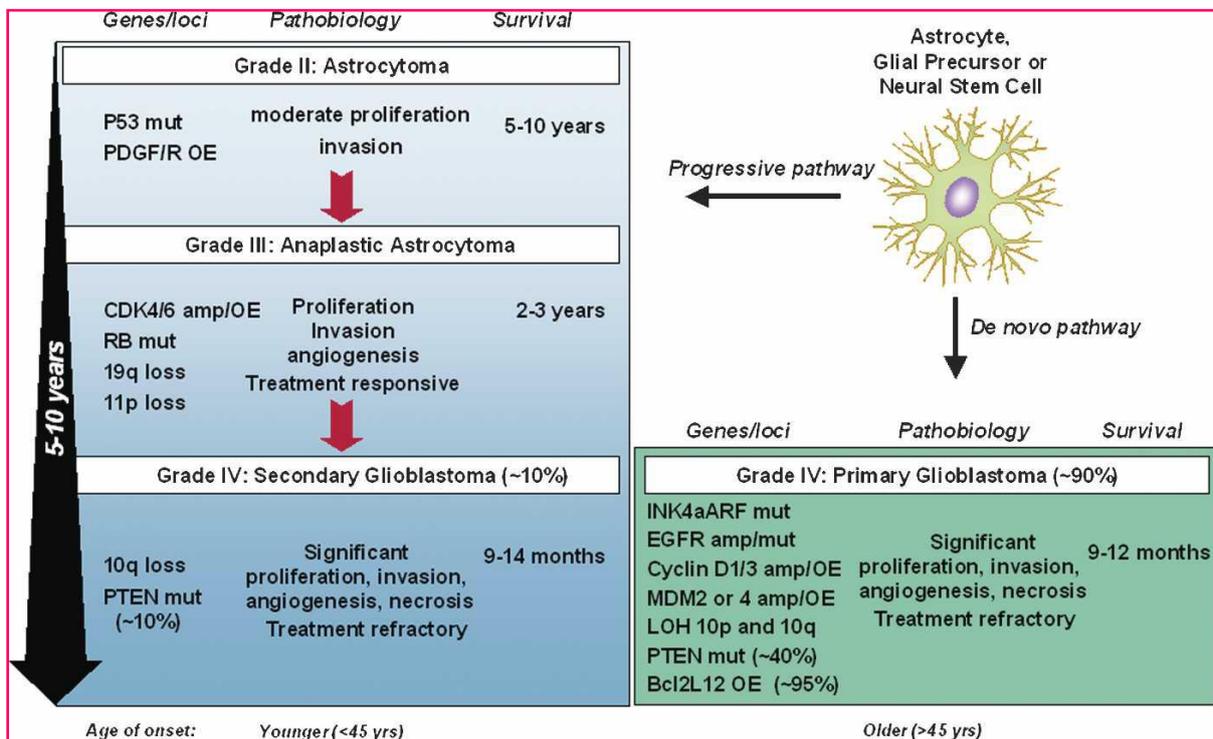


Figura 1. Aberraciones cromosómicas y genéticas involucradas en la génesis de los astrocitomas. Se muestra la relación entre supervivencia y lesiones moleculares que llevan a la formación del glioblastoma, o bien de forma primaria (*de novo*) o bien de forma secundaria (progresiva) (Furnari *et al.*, 2007).

1.2 Glioblastoma Multiforme (GBM)

La forma tumoral más común y biológicamente más agresiva del SNC es el glioblastoma multiforme (astrocitoma de grado IV), representando más del 50% de todos los gliomas primarios cerebrales. Se define por su proliferación celular incontrolable, infiltración difusa, tendencia a necrosis, angiogénesis robusta, gran resistencia a la apoptosis y gran inestabilidad genómica. Sin embargo, dos de los problemas fundamentales de este tipo de tumores son: su capacidad de infiltración a otras zonas del cerebro y/o médula espinal y su extrema resistencia a los tratamientos convencionales. La invasión del glioblastoma a los tejidos normales del cerebro y la médula espinal, evita a menudo la eliminación completa de las células tumorales después de una extirpación quirúrgica del tumor.

El glioblastoma multiforme puede ser además subdividido en GBM primario o secundario, basándose en las presentaciones clínicas. A pesar de que ambos parecen similares histológicamente, GBMs primarios y secundarios constituyen enfermedades distintas –afectan a grupos de personas con edades variadas, presentan diferentes velocidades de evolución de la enfermedad y tienen alteraciones genéticas y rutas de señalización distintas (Kanu *et al.*, 2009).

Los GBMs primarios, producidos por una mutación *de novo*, representan la mayoría de los casos de GBM en pacientes mayores (>45 años). Éstos aparecen sin síntomas previos ni antecedentes histológicos de tumor de bajo grado. Por el contrario, los GBMs secundarios o progresivos, son bastante raros (~10% de los casos) y tienden a ocurrir en pacientes con edad inferior a 45 años. Derivan de astrocitomas de bajo grado que acaban transformándose en un tumor de mayor grado, GBM o astrocitoma anaplásico, en un período que oscila entre 5-10 años (Louis *et al.*, 2007).

El tratamiento del GBM tiene dos puntos críticos que dificultan su total eliminación. El primero de ellos es la recurrencia del tumor y el segundo, la resistencia quimioterapéutica. El tratamiento inicial que recibe este tipo de pacientes es la resección quirúrgica, siendo prácticamente imposible su completa extirpación debido a la característica infiltrante del tumor. Precisamente este hecho es el que proporciona la recurrencia del tumor de las células tumorales que permanecen adheridas al tejido. En segundo lugar, se les administra un tratamiento de radio/quimioterapia con fármacos dirigidos a eliminar las células malignas que puedan quedar. Sin embargo, las células

tumorales que quedan adquieren resistencia a estos tratamientos, fenómeno conocido como resistencia extrínseca. También se puede dar el caso que el tratamiento en sí no sea efectivo, hecho conocido como resistencia intrínseca (Haar *et al.*, 2012). Una de las hipótesis que los investigadores empezaron a estudiar hace unos años debido a esta quimioresistencia del tumor, es la presencia de *Cancer Stem Cells* (CSCs) resistentes a los fármacos y con capacidad de regenerar un tumor en poco tiempo (Beier *et al.*, 2011).

1.3 Glioma Stem Cells: células madre del tumor

Se ha demostrado que existe una subpoblación de células altamente cancerígenas que poseen un gran potencial de iniciación y repoblación del cáncer. Estas células reciben el nombre de “*Cancer Stem Cells*” (CSCs) o células iniciadoras-propagadoras del tumor, ya que comparten características fundamentales con las células madre normales. El concepto de *cancer stem cells* no es un fenómeno reciente, pero se ha extendido recientemente a tumores cerebrales y se ha convertido en un elemento valioso para buscar nuevas dianas terapéuticas.

Las *Glioma stem cells* (GSCs) representan una fracción pequeña de la población total del tumor capaces de auto-dividirse, diferenciarse a diversos fenotipos y proliferar *in vitro*. Esta capacidad de auto-renovación ilimitada y su habilidad para repoblar y mantener el tumor, nos hace pensar que las GSCs son unas dianas prometedoras para terapias curativas. Probablemente, estas células dependen de alteraciones genómicas y rutas de señalización celular que difieren de las células más diferenciadas del tumor (non-GSCs). Por lo tanto, es probable que estas GSCs contribuyan a la resistencia a las terapias, que están dirigidas a genes y proteínas involucradas en la formación de la masa del tumor. Además, puede que también expresen elevados niveles de proteínas exportadoras de los fármacos contribuyendo a esta resistencia terapéutica (Kanu *et al.*, 2009).

Las *glioma stem cells* tienen el potencial de diferenciarse en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Figura 2). Estas células podrían ser el resultado de cambios genéticos y epigenéticos en las células madre/progenitoras neurales, o debido a una serie de cambios genéticos o de reprogramación epigenética de las células diferenciadas, como los astrocitos (Huang *et al.*, 2010).

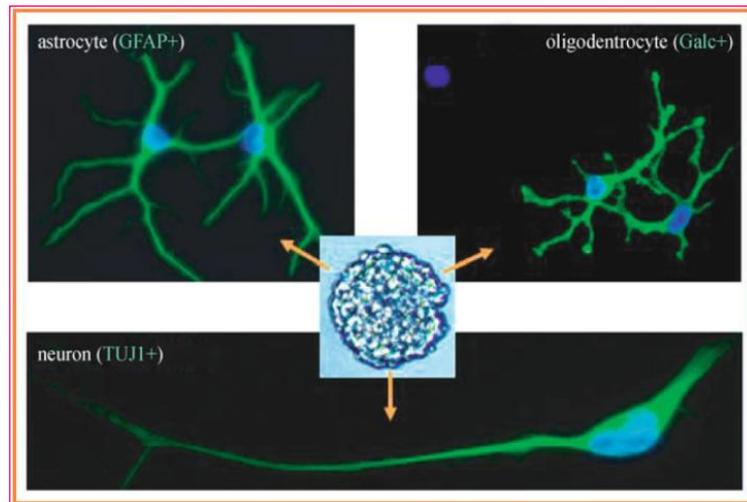


Figura 2. GBM stem cells (GSCs). Tienen la capacidad de diferenciarse a diferentes linajes. GSCs derivadas de un glioblastoma multiforme formando esferas tumorales y diferenciadas a células que expresan marcadores de astrocito (GFAP+), oligodendrocito (GalC+) y neurona (TUJ1+) tras la inducción de la diferenciación (Huang *et al.*, 2010).

Las GSCs están implicadas en diversos comportamientos malignos asociados con la progresión tumoral del glioblastoma multiforme. Se ha demostrado que expresan elevados niveles de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para mejorar la angiogénesis tumoral y que su resistencia a radiación es debida principalmente a la activación del punto de control (*checkpoint*) G2/M en respuesta a daño en el DNA y a su mejor capacidad para repararlo. Por lo tanto, el estudio de las GSCs podría llevar al descubrimiento de nuevas dianas moleculares que permitiesen mejorar la eficacia de las actuales terapias citotóxicas y anti-angiogénicas (Huang *et al.*, 2010).

2. Histona Desacetilasas (HDAC)

El cáncer es una enfermedad causada por cambios que se producen en el genoma y es un hecho que tanto las alteraciones genéticas como epigenéticas tienen un papel importante en el inicio y progreso del tumor. Por este motivo, compuestos dirigidos a enzimas como las Histona Desacetilasas (HDAC) han generado en los últimos tiempos un gran interés como fármacos anti-cancerígenos.

Un mecanismo importante en la regulación epigenética de la expresión génica es la remodelación de la cromatina. Sabemos que todo el genoma está empaquetado formando la cromatina, que es un macro-complejo dinámico formado por el DNA, las histonas y proteínas no-histonas. Así pues, la transcripción celular depende de la accesibilidad de los factores de transcripción al DNA y de cómo éste está compactado en la cromatina. La unidad principal del DNA son los nucleosomas, formado por un octámero de histonas envueltas de DNA. Por ello, la accesibilidad a éste dependerá de las modificaciones post-traduccionales que sufran las histonas.

Entre todas las modificaciones de la cromatina que existen, una de las más estudiadas y comunes es la acetilación de las histonas, la cual se ha visto implicada en el control de muchas funciones biológicas y, por otro lado, la alteración en los niveles de acetilación se ha relacionado con varias enfermedades y procesos tumorales. Esta acetilación se produce en los grupos amino de los residuos de lisina en las regiones N-terminal de las histonas. El estado de acetilación de las histonas está controlado por actividades competitivas de dos familias de enzimas: las Histona AcetilTransferasas (HATs) y las Histona Desacetilasas (HDACs) (Struhl, 1998) y, por lo tanto, son las que regulan el balance de lisinas acetiladas en las histonas y también en proteínas no-histonas. Generalmente, los genes activos transcripcionalmente están asociados con altos niveles de acetilación de histonas, mientras que bajos niveles de acetilación se relaciona con la represión transcripcional (Mai *et al.*, 2005).

Hoy en día se sabe que la transcripción aberrante de los genes que regulan la diferenciación celular, el ciclo celular y la apoptosis es debido a la expresión alterada o mutación de los genes que codifican para las HATs, HDACs, o para sus parejas de unión y reclutamiento (Mai *et al.*, 2005). La acetilación aberrante de proteínas, particularmente en las histonas, se ha relacionado con el cáncer, así como la expresión

anormal de las HDACs. Por ello, controlar el estado de acetilación modificando la actividad de las HDACs parece ser una terapia anti-tumoral prometedora.

Las HDACs se pueden clasificar en cuatro grupos: clase I, clase II, clase III y clase IV (Tabla 1) (Witt *et al.*, 2009).

- **Clase I.** HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8 se encuentran principalmente en el núcleo, aunque se ha sugerido que la HDAC3 podría estar localizada además en el citoplasma. Éstas catalizan la desacetilación de las histonas causando condensación de la cromatina y el silenciamiento génico.
- **Clase II.** HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10, son capaces de translocarse fuera y dentro del núcleo en respuesta a ciertas señales celulares, afectando a la actividad de factores de transcripción.
- **Clase III o Sir2 (sirtuinas).** Pertenecen a la familia de proteínas desacetilasas NAD⁺-dependientes y difieren evolutivamente de las otras clases.
- **Clase IV.** HDAC11. Se localiza en el núcleo. Estructuralmente está relacionada con las HDAC de clase I, pero también presenta similitudes con las de clase II.

	HDAC family member	Substrates	Binding Partners	Tissue Expression	mouse knock out phenotype
class I	HDAC1	N p53, MyoD, E2F-1, Stat3, androgen	Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST	ubiquitous	embryonic lethal day 9.5, p21 and p27 up-regulation, reduced overall HDAC activity
	HDAC2	N Bcl-6, Stat3, glucocorticoid receptor, YY-1	Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST	ubiquitous	viable until perinatal period, fatal multiple cardiac defects, excessive hyperplasia of heart muscle, arrhythmia
	HDAC3	N GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP	N-CoR/SMRT	ubiquitous	embryonic lethal before day 9.5, defective cell cycle, DNA repair and apoptosis in embryonic fibroblasts. Conditional liver knock out results in hepatocyte hypertrophy and induction of metabolic genes
	HDAC8	N/C nd	EST1B	ubiquitous	nd
class II A	HDAC4	N/C GCMa, GATA-1, HP-1	ANKRA, RFXANK	heart, smooth muscle, brain	viable, premature and ectopic ossification, chondrocyte hypertrophy
	HDAC5	N/C Smad7, HP-1, GCMa	REA, estrogen receptor	heart, smooth muscle, brain	myocardial hypertrophy, abnormal cardiac stress response
	HDAC7	N/C FLAG1 and 2	HIF1a, Bcl-6,	heart, placenta, pancreas, smooth muscle	embryonic lethal, lack of endothelial cell-cell adhesion
	HDAC9	N/C nd	FOX3P	smooth muscle, brain	viable at birth, spontaneous myocardial hypertrophy
class II B	HDAC6	C a-Tubulin, HSP90, SHP, Smad7	nd	kidney, liver, heart, pancreas	viable, no significant defects, increase in global tubulin acetylation. MEFs fail to recover from oxidative stress
	HDAC10	C HSP90?	nd	spleen, kidney, liver	nd
class IV	HDAC11	N/C nd	HDAC6?	heart, smooth muscle, kidney, brain	nd

Abbreviations: MEFs, mouse embryonic fibroblasts; N, nuclear; C, cytoplasmic; N/C, nuclear and cytoplasmic; nd, no data

Tabla 1. HDACs: función molecular y su papel en el desarrollo normal (Witt *et al.*, 2009).

Aunque todavía no se ha demostrado ninguna implicación directa de las HDACs en la oncogénesis de humanos, se conoce ahora que las HDACs están asociadas con un gran número de oncogenes y genes supresores de tumores, conduciendo a un reclutamiento aberrante de la actividad de las HDACs, lo que resulta en cambios en la expresión génica (de Ruijter *et al.*, 2003).

En el ámbito del cáncer, están siendo identificados los procesos moleculares que conducen a la expresión inadecuada de genes debido a la alteración de la estructura de la cromatina con lo que la acetilación errónea de las colas de las histonas se ha relacionado estrechamente con la carcinogénesis. Por lo tanto, dirigirse a las alteraciones en la transcripción que conducen a la neoplasia ofrece una oportunidad para la intervención terapéutica en el ápice del proceso de formación del tumor. Estas terapias podrían afectar a diversos programas moleculares, por lo tanto, serían más poderosas que dirigirse únicamente a las últimas etapas de una sola ruta molecular (Johnstone, 2002).

3. Estrategias Terapéuticas

El tratamiento inicial que reciben los pacientes que padecen cáncer es la resección quirúrgica, con la finalidad de eliminar la mayor parte del tumor, siendo en este caso prácticamente imposible su completa extirpación debido a la característica infiltrante del tumor. Es por ello que cualquier célula cancerígena que le pueda quedar al paciente es la que puede proporcionar la recurrencia del tumor de las células tumorales que permanecen adheridas al tejido. En segundo lugar, se les administra un tratamiento de radio/quimioterapia con fármacos dirigidos a eliminar las células malignas que puedan quedar. A continuación detallaremos agentes terapéuticos que actualmente se están utilizando o probando en ensayos clínicos para el tratamiento del GBM y que han sido motivo de estudio en este proyecto.

3.1 El Agente alquilante Temozolomida (TMZ)

Temozolomida es el principal agente quimioterapéutico que se está utilizando hoy en día para el tratamiento del glioblastoma multiforme. Se trata de una droga alquilante que fue aprobada inicialmente por la *US Food and Drug Administration* (FDA) en 1999 para el tratamiento de pacientes adultos diagnosticados con GBM en estadios iniciales y también para el astrocitoma anaplásico refractario (Villano *et al.*, 2009). Este fármaco hizo aumentar la esperanza de vida de muchos pacientes con tumores cerebrales primarios, puesto que se había observado una mejoría en la esperanza de vida media, que no se observaba desde el descubrimiento de la radioterapia –mediados 1970. Por ello, TMZ surgió como una nueva droga terapéutica porque, aunque la radioterapia es el principal tratamiento de los gliomas de alto grado, únicamente la resección del tumor es inadecuada debida a la capacidad de infiltración de este tipo de tumores.

En 2002 y 2005, se publicaron ensayos en fase II y III, donde empleaban TMZ con radioterapia concurrente seguida de monoterapia con TMZ en pacientes con GBM diagnosticados en estadios tempranos, viéndose aumentada la vida media de los pacientes. Más adelante, TMZ se aprobó por la Unión Europea para el tratamiento de pacientes con GBM que mostraban recurrencia después de una terapia estándar y,

recientemente, se ha aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con astrocitoma anaplásico que han recaído después del tratamiento. Por estos resultados y debido a que TMZ es una droga tolerable, efectiva y fácil de administrar, es una terapia muy usada por los oncólogos en este tipo de cáncer.

Temozolomida representa una nueva clase de pro-droga de segunda generación, un derivado imidazotetrazina del agente alquilante dacarbazine, con la característica estructural única de contener tres átomos de nitrógeno adyacentes, ofreciéndole así propiedades físico-químicas únicas. Se trata de un agente oral alquilante capaz de cruzar la barrera hematoencefálica del cerebro y que tiene actividad anti-tumoral de amplio espectro en modelos de xenotransplante en ratón.

TMZ se absorbe bien después de la administración oral y su vida media es de aproximadamente 1.8 horas. Cuando TMZ se administra consecutivamente con radiación, la dosis recomendada es de $75\text{mg}/\text{m}^2$ por día (Villano *et al.*, 2009). Seguido de su administración oral, se hidroliza mediante una reacción espontánea no enzimática y a condiciones de pH fisiológico, a 5-(Metil)-1-(Triazenil-1)-Imidazol-4-Carboxamida (MTIC) y también en el metabolito activo dacarbazine (Figura 3). La molécula MTIC es capaz de metilar el DNA en diferentes bases, y finalmente, el producto 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) es degradado y excretado por los riñones.

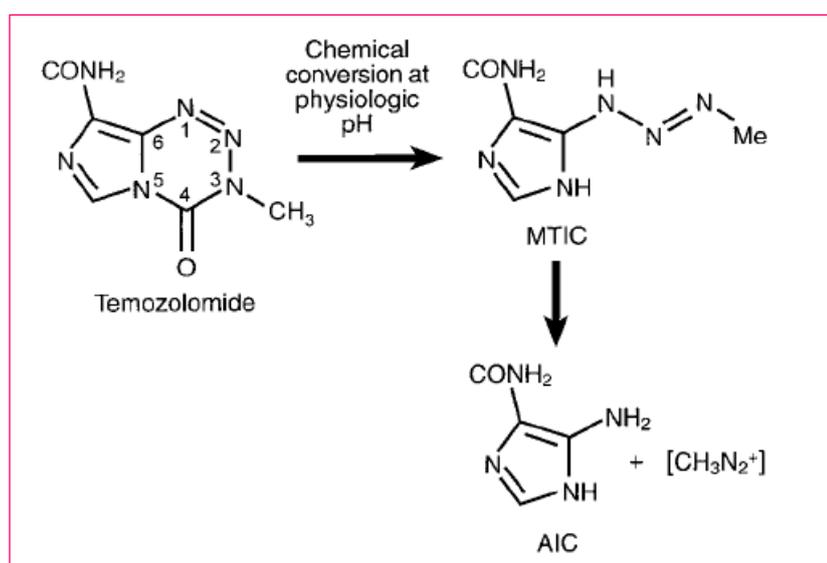


Figura 3. Estructura química de TMZ y su conversión espontánea en MTIC, tras la apertura del anillo que forma TMZ liberándose CO_2 para formar esta molécula capaz de metilar el DNA (Friedman *et al.*, 2000)

La metilación del DNA parece ser el principal mecanismo responsable de la citotoxicidad de TMZ para las células malignas (Friedman *et al.*, 2000). Las lesiones más comunes que se producen al DNA tras el tratamiento con TMZ son la metilación de Guanina en la posición N⁷ (N⁷-G), la metilación de Adenina en posición O³ (O³-A) y la metilación de Guanina en la posición O⁶ (O⁶-G), representando las dos primeras la mayoría de las metilaciones. Aunque la alquilación de los productos de Guanina en la posición O⁶ representa un 5% de los aductos del DNA, éstos son los principales responsables de los efectos citotóxicos de temozolomida. La O⁶-G metilada (O⁶-meG) se empareja de forma incorrecta (conocido como *missmatch*) con una Timina (O⁶-G-T) en lugar de hacerlo con su base natural, en la primera replicación del DNA después del inicio del tratamiento. Este emparejamiento erróneo inducirá la activación de sistemas de reparación que serán inútiles y que se irán repitiendo continuamente produciéndose más emparejamientos erróneos. Estas lesiones que se forman como consecuencia de la mala reparación de las bases, acabarán produciendo lesiones terciarias como son la rotura de la doble cadena del DNA (*double strand breaks, DSB*) y consecuentemente, muerte por apoptosis y/o autofagia. Es por ello que el mecanismo citotóxico de TMZ parece ser el fallo en el sistema de reparación de *missmatch* (MMR) para encontrar una base complementaria a la Guanina metilada (Kanzawa *et al.*, 2003).

Se ha postulado que el enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT) es el responsable de reparar las lesiones O⁶-meG y, por lo tanto, se piensa que elevados niveles de MGMT contribuyen a la resistencia de las células al tratamiento con TMZ. Por el contrario, la metilación del promotor de MGMT silencia el gen y, por ello, se esperaría un aumento de la citotoxicidad debido a las lesiones O⁶-meG (Hegi *et al.*, 2005). El nivel de expresión de MGMT en los tumores es bastante variable, siendo baja la expresión en tumores cerebrales, aparentemente debido a la metilación del promotor de MGMT (Esteller *et al.*, 1999). MGMT repara las lesiones O⁶-meG transfiriendo el grupo metil de los aductos a su propio residuo de cisteína. Posteriormente, MGMT metilado es degradado. Es por ello, que MGMT es considerada como una proteína de reparación suicida y la célula ha de sintetizarla nuevamente para continuar reparando el DNA (Figura 4) (Villano *et al.*, 2009). Por otro lado, se realizaron ensayos donde se modulaba la actividad de MGMT mediante la inhibición farmacológica con O⁶-benzylguanine (O⁶BG) o por eliminación de MGMT por transfección, concluyéndose que O⁶-meG es la mayor lesión proapoptótica del DNA en células malignas de glioma como consecuencia del tratamiento con agentes O⁶-metilantes. Por todos estos

resultados y viéndose que la expresión de MGMT protege enormemente de la apoptosis inducida por O⁶-meG, se confirmó que MGMT es un factor decisivo y determinante a la resistencia de los gliomas a los agentes O⁶-metilantes (Roos *et al.*, 2007).

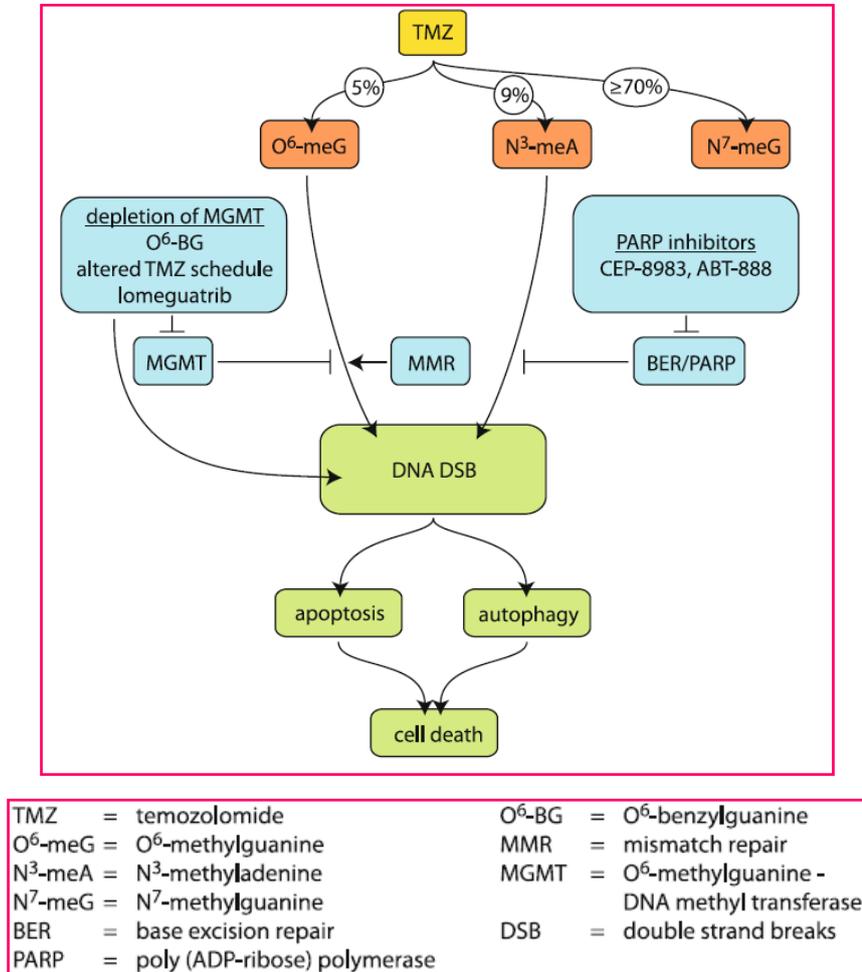


Figura 4. Temozolomida: sitios y dianas terapéuticas. La metilación de O⁶-G causa el mayor efecto citotóxico promoviendo la formación de DSB en el DNA y, consecuentemente, la muerte celular vía apoptosis y/o autofagia (Villano *et al.*, 2009).

Como resumen, podemos concluir que la resistencia que adquieren las células tumorales al tratamiento con temozolomida se podría explicar con varias hipótesis, como son: la expresión de MGMT, la complejidad de las múltiples proteínas y rutas que se encuentran alteradas en GBM (por ejemplo, los sistemas de reparación del DNA) y la existencia de GSCs. Por todo ello, lo que queda claro es que para que el tratamiento con TMZ sea efectivo, es necesario que las células dispongan de un sistema de reparación de los emparejamientos erróneos intacto junto con todo aquello que esté involucrado en

esta cascada de señalización, así como también se necesita una modificación/inhibición en la expresión del enzima MGMT, en caso de que éste se encuentre expresado en las células del tumor en concreto. También es importante que el mecanismo por el cual diversas moléculas están encargadas de la ejecución de la formación de DSB en el DNA se encuentre intacto.

3.2 Nuevas aproximaciones terapéuticas

3.2.1 TRAIL

La activación de la apoptosis en células tumorales es la base de muchas terapias contra el cáncer y en este sentido, TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) induce una vía de muerte apoptótica capaz de matar estas células cancerígenas.

TRAIL, también conocido como Apo2L, es un tipo de proteína transmembrana de tipo II perteneciente a la Superfamilia de Factores de necrosis tumoral (TNF) que se expresa en la superficie de células *Natural Killer* (NK) y células T, macrófagos y células dendríticas. Esta proteína es sintetizada como una pro-forma que queda anclada a la membrana y el extremo extracelular C-terminal cortado de la superficie celular es liberado.

Como otros miembros de la familia TNF, TRAIL forma homotrímeros que se unen a tres moléculas receptoras que se encuentran en la superficie de la célula provocando así la activación de la señal de la apoptosis. TRAIL es capaz de unirse a dos tipos de receptores (Figura 5): a) receptores de muerte DR4 y DR5, esta unión provocará la activación del proceso de apoptosis; y b) receptores señuelo o *decoy* DRC1 y DRC2, que posiblemente inhiba esta ruta. Además, puede unirse a OPG (inhibidor soluble del ligando RANK) con una afinidad bastante baja (Johnstone *et al.*, 2008).

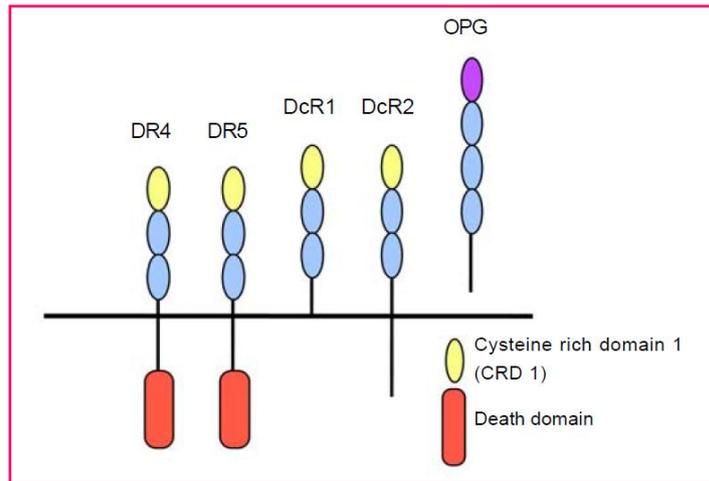


Figura 5. TRAIL y sus receptores. TRAIL es capaz de interaccionar con los miembros de la familia de receptores de TNF. Los receptores de muerte, DR4 y DR5, contienen un DD (*death domain*) en su región intracelular, esencial para la señalización de la apoptosis. Por otro lado, los receptores señuelo, DcR1 y DcR2, compiten con DR4 y DR5 para unirse a TRAIL. OPG es capaz de unirse a TRAIL con baja afinidad. Los colores representan los dominios extracelulares: azul, representa la primera parte del CRD1 con una unión a cisteína y en amarillo, el resto de dominios, llenos de residuos de cisteína (Johnstone et al., 2008).

Estudios funcionales han demostrado que este ligando tiene un gran potencial para activar el proceso apoptótico en una amplia variedad de líneas celulares tumorales, pero no en células normales, destacando su potencial para la aplicación terapéutica en el tratamiento del cáncer (Wang and El-Deiry, 2003). Por lo tanto, el uso de TRAIL recombinante (TRAILr) es una estrategia anti-tumoral atractiva. Actualmente, se están llevando a cabo estudios pre-clínicos en ratones y primates no-humanos en los que se ha demostrado que formas solubles de TRAILr suprimen el crecimiento de tumores humanos xenotrasplantados, sin que se aprecie ningún tipo de toxicidad. También se están realizando ensayos con anticuerpos humanos agonistas de DR4 ó DR5, donde se muestra que estos agentes tienen actividades anti-tumorales contra xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunodeficientes sin toxicidad aparente (Johnstone *et al.*, 2008).

Sin embargo hay que tener en cuenta que, además de su papel en promover la señal apoptótica a través de la activación de caspasas, TRAIL puede también activar diversas rutas de señalización intracelular como por ejemplo, el factor de transcripción NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), y las vías de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y las

MAPK (*mitogen activated protein kinase*), que por el contrario pueden promover la supervivencia y proliferación celular. Por ello, la participación de una o más de estas rutas de una manera que predomine sobre la señal pro-apoptótica, puede tener efectos contrarios a los esperados en la aplicación terapéutica de TRAIL y los anticuerpos agonistas de TRAIL.

3.2.2 Inhibidores de las HDAC (HDACi)

Comprender cómo la expresión génica puede ser regulada, abre la puerta para el desarrollo de nuevas herramientas moleculares que sean capaces de reprogramar la transcripción, inhibiendo así el crecimiento y progresión celular del tumor. Los inhibidores de las histona desacetilasas (HDACi) representan una nueva forma de medicamentos contra el cáncer y las perspectivas de futuro son interesantes.

Los inhibidores de las histona desacetilasas son pequeñas moléculas epigenéticamente activas que inducen la hiperacetilación de las histonas, de forma que reactivan así la expresión de ciertos genes que estaban siendo reprimidos. Esta reprogramación génica induce efectos celulares pleiotrópicos, ya que son genes que están implicados en diferentes procesos como diferenciación, apoptosis, progresión del ciclo celular, autofagia, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y vías de reparación de daño al DNA. Los HDACi bloquean el acceso al sitio activo (reversible o irreversible) de las HDACs, inhibiendo por tanto el crecimiento y supervivencia de las células tumorales (Johnstone, 2002).

Estos inhibidores tienen en común el farmacóforo formado por una cabeza, una unidad de conexión, un enlace y un grupo de unión a zinc que se encarga de secuestrar el catión en el dominio catalítico de la HDAC a la que se dirige (Bertrand, 2010). Actualmente, los HDACi se clasifican de acuerdo a su estructura química, y cada uno de ellos varía en su habilidad para inhibir individualmente a las HDACs. Existen cuatro grupos de HDACi: ácidos hidroxámicos (como el suberoylanilide), ácidos grasos de cadena corta (como el ácido valproico), tetrapéptidos cíclicos/epóxidos y benzamidas (Dickinson *et al.*, 2010). Según su estructura, su capacidad de inhibición de los distintos miembros de la familia de las HDAC varía, existiendo compuestos que inhiben únicamente a las HDAC de clase I, y otros que inhiben tanto las de clase I como las de clase II (Tabla 2).

Inhibitor	class I				class II A				class II B		class IV
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9	HDAC6	HDAC10	HDAC11
pan-inhibitors	TSA				nd					nd	nd
	Vorinostat (SAHA)				nd					nd	nd
	NVP-LAQ824				nd					nd	nd
	Panbinostat				nd					nd	nd
	Belinostat				nd					nd	nd
	PCI-24781				nd	nd	nd	nd			nd
class I inhibitors	MS-275					nd				nd	nd
	MGCD0103							nd		nd	nd
	Depsipeptide			nd	nd		nd	nd		nd	nd
	Apicidin						nd			nd	nd
	Valproic acid					nd	nd			nd	nd
	Trapoxin		nd	nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd
	SB-429201		nd			nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Bispyridinum diene				nd		nd	nd	nd	nd	nd
	SHI-1:2								nd	nd	nd
	R306465		nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd
	SB-379278A		nd			nd	nd	nd	nd	nd	nd
	PCI-34051					nd	nd	nd	nd		nd
Cpd2		nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd	
class II inhibitors	APHA derivatives		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Tubacin		nd	nd	nd	nd	nd	nd		nd	nd
	Mercaptoacetamide			nd		nd	nd	nd			nd
	NCT-10a/14a		nd	nd	nd	nd	nd	nd		nd	nd

Depicted are relative inhibitory potency of several pan-, class I selective, and class II selective compounds against HDACs1-11

strong inhibition (EC50 < 5fold x EC50 relative to most sensitive HDAC isoform)
 weak inhibition (EC50 > 5fold x EC50 relative to most sensitive HDAC isoform)
 no inhibition (EC50 > 100fold x EC50 relative to most sensitive HDAC isoform)
 nd no data published

Tabla 2. Perfil de actuación de los inhibidores de las HDAC (Witt *et al.*, 2009).

El tratamiento de células cancerígenas con inhibidores de las HDAC puede inducir una serie de efectos, como son apoptosis de las células tumorales, parada del ciclo celular, diferenciación y senescencia, cambios en la respuesta inmune y alteración de la angiogénesis (Figura 6) (Bolden *et al.*, 2006).

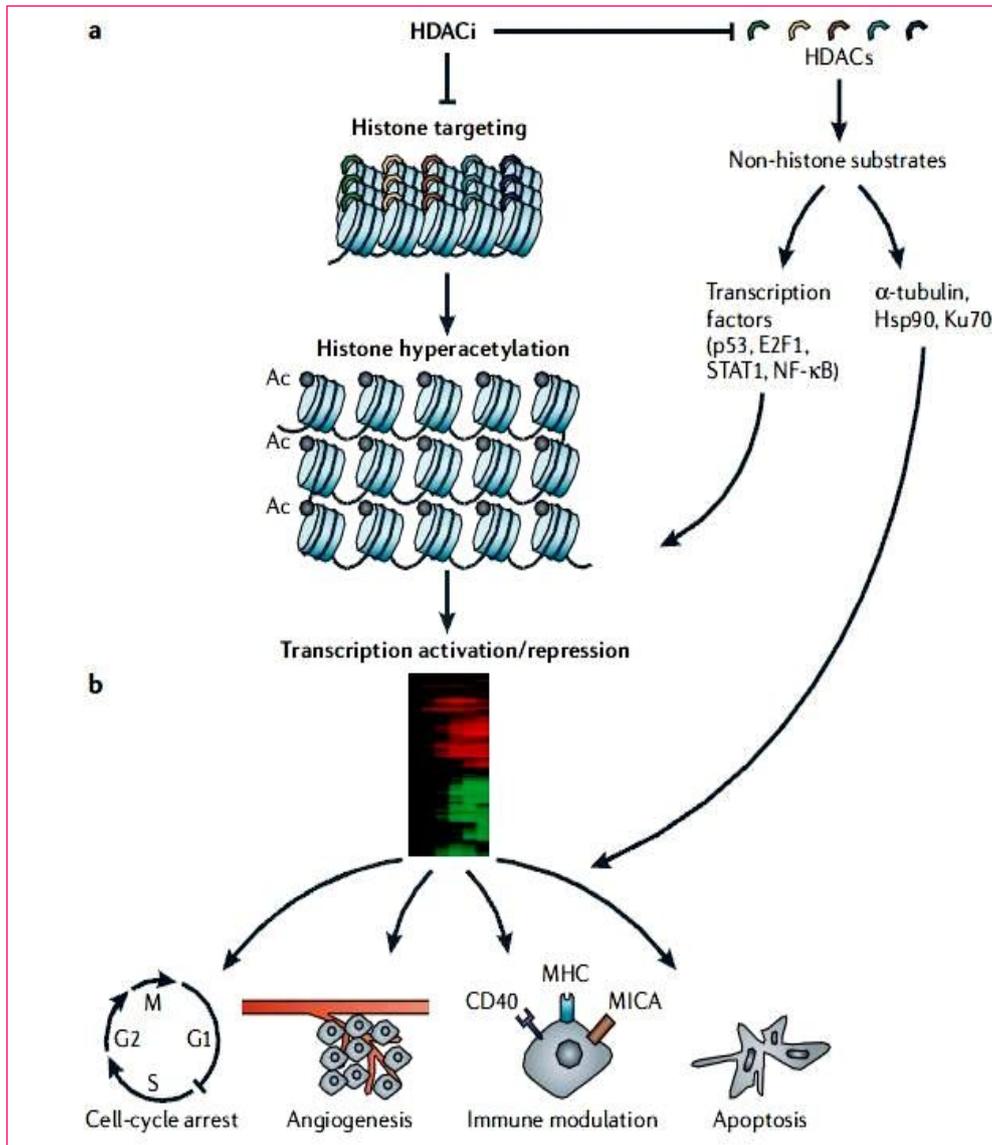


Figura 6. Efectos de los inhibidores de las desacetilasas de histona. **A)** Además de regular la acetilación de las histonas, las HDACs pueden unirse, desacetilar y regular la actividad de un variado número de proteínas, incluyendo factores transcripcionales y otras proteínas con diversas funciones biológicas. La hiperacetilación de factores transcripcionales con los HDACi puede aumentar su actividad reguladora de genes y, por lo tanto, contribuir a cambios en la expresión génica. **B)** Efectos anti-tumorales de los HDACi. Los HDACi pueden afectar al crecimiento y supervivencia celular tumoral a través de múltiples efectos biológicos (Bolden *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que los inhibidores de las desacetilasas de histona alteran el crecimiento de varios tipos de cánceres. Estas moléculas, muchas de las cuales han sido aisladas de fuentes naturales, han demostrado la capacidad de inhibir la proliferación, inducir diferenciación y causar apoptosis en las células tumorales. Recientes estudios pre-clínicos han definido que existe una correlación directa entre

la habilidad de los HDACi de matar las células tumorales y su eficacia terapéutica (Bots and Johnstone, 2009).

- HDACi como terapia contra el cáncer

Un gran número de HDACi está siendo utilizado en ensayos clínicos para tratar enfermedades hematológicas y neoplásicas sólidas. Vorinostat (suberoyanilide, SAHA) fue aprobado por la FDA en Octubre 2006 para uso clínico en el tratamiento de linfoma de células T cutáneo (Lee *et al.*, 2010), y debido a su éxito, actualmente se está utilizando en ensayos clínicos de otras enfermedades, entre otras el GBM, aunque con menor eficacia por el momento. Por último, el ácido valproico (VPA) fue aprobado inicialmente por la US FDA en Febrero 1978 para su uso en psiquiatría como antiepiléptico y en el tratamiento de trastornos bipolares en adultos (Delcuve *et al.*, 2012).

3.2.3 Terapia combinada: mejorando la respuesta al tratamiento

Debido a la dificultad de encontrar una única terapia que sea completamente efectiva contra los tumores cerebrales, básicamente por su alta capacidad de infiltración, surge la idea de combinar dos o más agentes terapéuticos. Aunque estos fármacos tengan diferentes mecanismos citotóxicos se pretende determinar si su combinación es capaz de producir efectos aditivos o sinérgicos que resulten todavía más beneficiosos para los pacientes.

-Uso de HDACi con otros agentes. La combinación de HDACi con otros agentes pro-apoptóticos podría resultar en apoptosis sinérgica y efectos anti-tumorales superiores comparado con aquellos resultados en los que se usa un solo agente. Se piensa que debido a la alteración de proteínas reguladoras de la apoptosis en células tratadas con HDACi, estos agentes podrían sensibilizar a las células de los efectos apoptóticos de otras drogas que causen daños al DNA, y también sensibilizar a estas células a la irradiación (IR). Muchas de estas estrategias donde se combinan varios HDACi con otros agentes, se han testado positivamente en diversos experimentos de laboratorio. Debido a estos resultados favorables, se han empezado

a probar estas combinaciones en ensayos clínicos para evaluar tanto su seguridad como su eficacia. Estudios iniciales con HDACi combinados con otros fármacos, aprobados por la FDA, se han validado clínicamente como agentes radio/quimioterapéuticos por aumentar sus efectos anti-tumorales. Dentro de estas combinaciones encontramos drogas como bortezomib, azacitidine y decitabine, que ya fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de mieloma múltiple (primer fármaco) y el síndrome mielodisplásico (dos últimos fármacos). La mayoría de estos ensayos clínicos todavía se siguen evaluando para determinar el régimen de dosis a administrar y asegurar su seguridad, aunque en algunos estudios ya se obtienen resultados esperanzadores. Este es el caso de la combinación de inhibidores de la DNA metiltransferasa (DNMTi) con Vorinostat, uno de los inhibidores de HDAC más utilizado en terapia combinada. Esta combinación ha sido bien tolerada por los pacientes y parece ser efectiva tanto en tumores sólidos como en mieloma múltiple, aunque aparecen efectos secundarios (efectos neurológicos) de los que se desconoce su causa (Bots and Johnstone, 2009). Por otro lado, se ha evaluado la combinación de HDACi junto con IR, viéndose aumentada la radiosensibilización de las células tumorales. Un ejemplo de ellos es la combinación de ácido valproico (VPA) con IR, donde se aumenta la eficacia terapéutica de los tratamientos en modelos de xenoinjertos en ratón, comparado con el efecto de un solo agente (Frew *et al.*, 2009).

-*Combinando HDACi con TRAIL*. Otra de las posibles terapias combinadas que también se está estudiando y que tiene un gran interés, es la combinación de HDACi junto con el ligando TRAIL o anticuerpos agonistas del receptor. La base de esta terapia es el hecho de que se ha visto que los HDACi inducen la expresión de los receptores de TRAIL, lo que resultaría en un aumento de la apoptosis mediada por TRAIL. Estos resultados observados *in vitro* sugieren que la combinación de HDACi con agentes inductores de la muerte por apoptosis como TRAIL puede resultar terapéuticamente favorable (Johnstone *et al.*, 2008).

-*TRAIL y otros compuestos*. En muchas publicaciones se ha demostrado que la combinación de compuestos o anticuerpos que activan la ruta de TRAIL con un amplio y variado número de agentes anti-cancerígenos resultan en una muerte aditiva o sinérgica de las células tumorales. Se piensa que el modo en que diferentes agentes quimioterapéuticos hacen sinergia con TRAIL para mediar este aumento en la muerte, es la inducción de la expresión de receptores de TRAIL (DR4 y DR5) y el

hecho de que se está promoviendo la localización de los receptores en los “*lipid rafts*” de la membrana celular. Una de las posibles combinaciones que se está investigando, es el uso de TRAIL junto con inhibidores de la vía NF- κ B. Se ha visto que si esta ruta se encuentra activa constitutivamente, tras la unión de TRAIL a DR4 o DR5 se puede producir una inhibición de la apoptosis. Por lo tanto, se piensa que utilizando agentes que inhiban la activación de la ruta NF- κ B estamos promoviendo la muerte celular inducida por TRAIL. Este es un simple ejemplo, puesto que existen muchas alternativas para la combinación con TRAIL como son: inhibidores de kinasas, inhibidores de las IAP (*inhibitor apoptosis protein*) y combinación con inmuno-terapias; entre otras.

-Tratamiento combinado de HDACi junto con TMZ. Se realizó en primer lugar un ensayo clínico en fase I donde se evaluaron diferentes dosis de Vorinostat con TMZ. No se observó ningún tipo de interacción farmacocinética entre ambos compuestos y, viendo que la media del número de ciclos de esta combinación era relativamente alta, se sugirió que esta terapia combinada se podía realizar en un régimen de período largo con efectos secundarios manejables. Basándose en los resultados del ensayo clínico en fase I, actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase II en el que se combina Vorinostat con radioterapia y simultáneamente con TMZ en pacientes con GBM recién diagnosticado (Carrier and Greenebaum, 2013).

-Temozolomida en combinación con otros fármacos. Además de la combinación con HDACi, se ha estudiado la combinación de temozolomida con otros agentes. Uno de éstos, es la O⁶-benzylguanina (O⁶-BG), que inhibe la actividad del enzima MGMT, como ya hemos mencionado importante en la resistencia a TMZ. Se han realizado ensayos en fase I, en los que se pre-trataba las células con O⁶-BG seguido de TMZ. Se observó un aumento de la actividad de TMZ tanto *in vitro* como *in vivo* en células tumorales, pero únicamente en células que tenían una expresión elevada de DNA α -glucosiltransferasa (AGT), que es un enzima importante en la resistencia a TMZ. Importante mencionar que la tolerancia del paciente a ambos agentes se mantenía y que se obtuvo un retraso del crecimiento tumoral (Friedman *et al.*, 2000). Por otro lado, también se ha combinado TMZ con un agente conocido como lomeguatrib, que es un fármaco que inhibe MGMT de forma similar al anterior. Sin embargo, en estos ensayos no se mejoraba la sensibilidad a TMZ en células con un sistema deficiente en la reparación de emparejamientos erróneos

(Villano *et al.*, 2009), destacando así el papel importante que tiene el sistema MMR en la citotoxicidad y resistencia de TMZ.

Estas combinaciones son sólo pequeños ejemplos de estudios que se están llevando a cabo actualmente. Como podemos observar, son diversas las combinaciones que se pueden realizar, debido a que en células tumorales son muchas las vías que se encuentran alteradas y es difícil encontrar agentes terapéuticos que restablezcan los niveles normales de estas rutas sin verse afectadas las células normales de alrededor. Por ello, es muy importante evaluar primero la eficacia y seguridad de estos compuestos, tanto individualmente como en conjunto, antes de poder aprobarse como terapia. Además, sabemos que quedan muchos puntos pendientes por estudiar, ya que por ejemplo, los eventos moleculares que conllevan la muerte sinérgica por apoptosis inducida por los HDACi en combinación con otros agentes, todavía tienen que estudiarse en profundidad para definirse completamente. Por lo tanto, profundizar más, tanto en los mecanismos de acción como en los mecanismos de resistencia a los HDACi, nos ayudará a entender con más claridad cómo actúan para así poder diseñar nuevas estrategias combinatorias. Lo que está claro es que la terapia con HDACi es muy prometedora para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, tanto hematológicos como tumores sólidos, especialmente cuando se usa en combinación con otras drogas terapéuticas.

4. Muerte Celular

Desde las primeras definiciones de los mecanismos de muerte celular programada (a mediados de la década de 1960), se han realizado varios intentos por clasificar los tipos de muerte celular que existen, basándose en las características morfológicas. En esta primera clasificación, se podían distinguir principalmente dos tipos de mecanismos, apoptosis y necrosis. Sin embargo, esta clasificación se fue ampliando conforme iban apareciendo nuevos ensayos bioquímicos que se fueron incluyendo en la rutina de los laboratorios. Así pues, en 2009 el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) propuso una serie de recomendaciones para la definición de las distintas morfologías de muerte celular y para el uso apropiado de la terminología relacionada con la muerte de las células. Además, fue entonces cuando se decidió que había llegado el momento de cambiar la forma de clasificar los tipos de muerte, basándose ahora, no en la morfología, sino en los aspectos moleculares. Así pues, los tipos de muerte celular se pueden clasificar ahora en apoptosis (extrínseca o intrínseca), necrosis, autofagia y catástrofe mitótica (Galluzzi *et al.*, 2012).

Las células pueden ser eliminadas en cualquier momento del ciclo celular. Esta eliminación puede ser mediada o bien por la acción de agentes externos o bien por mecanismos internos de la propia célula. En resumen, aunque todas las vías de muerte desencadenan un mismo final, la muerte de la célula, éstas representan sistemas moleculares completamente diferentes.

4.1 **Necrosis**

Hasta hace poco, la necrosis era considerada como una forma de muerte que ocurría de forma accidental y se clasificaba morfológicamente cuando no presentaba características ni de apoptosis ni de autofagia. Sin embargo, tras años de investigación, se ha demostrado que la necrosis ocurre regularmente y tiene un papel significativo en procesos tanto fisiológicos como patológicos.

La necrosis celular sucede cuando algún tipo de agente externo (por ejemplo, agentes tóxicos, excitotoxinas, agentes infecciosos; entre otros) actúa sobre las células induciendo su muerte. Se ha entendido la necrosis como una muerte celular no controlada que promueve reacciones inflamatorias en los tejidos circundantes y puede favorecer la diseminación de patógenos en un huésped susceptible. Así pues, la necrosis se caracteriza por una serie de eventos moleculares que provocan efectos como son aumento de volumen celular, ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular, así como también la dilatación de algunos orgánulos. Todos estos eventos desencadenarán finalmente una reacción inflamatoria.

Uno de los modelos que se ha descrito para intentar explicar la cascada de señalización de la necrosis, envuelve una vía de señalización por receptores de muerte. Se ha visto que, cuando la caspasa-8 es inhibida tanto genética como farmacológicamente, se activan proteínas como RIP1 y RIP3 (*receptor-interacting protein kinase 1 and 3*) que finalmente inducen la necrosis regulada. Aunque todavía no está claro cuál es el mecanismo exacto de esta cascada *downstream* de RIP1/3, lo que sí queda claro ahora es que la unión de ligandos de algunos receptores de muerte, en concreto TNF α -R1, puede provocar tres procesos biológicos diferentes: a) activación de la ruta de supervivencia NF- κ B, b) activación de caspasa-8 y ejecución de la apoptosis, o c) activación del complejo RIP1/RIP3 y la consecuente necrosis celular (Galluzzi *et al.*, 2011).

4.2 Apoptosis

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada (PCD), es una forma de muerte celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario (Jacobson, 1997). El proceso apoptótico es considerado como un mecanismo de muerte desencadenado por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas, o por estimulaciones exógenas ambientales. Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas, que conducirán finalmente a la muerte celular (Borden *et al.*, 2008). Aunque existe una gran variedad de estímulos que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células

responderán de la misma manera, ni les producirá el mismo efecto. En algunos casos, es el tipo de estímulo y/o la intensidad de éste, por ejemplo dosis bajas o altas de radiación, fármacos o la hipoxia; el que determinará si una célula muere por apoptosis o por necrosis respectivamente.

Así pues, la apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una serie de modificaciones como son contracción nuclear y citoplasmática y, es por ello, que las células son más pequeñas. Además, sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear (picnosis), desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de los organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana (*blebbing*), aunque no se rompa. Durante el proceso final, ocurre la fragmentación del DNA y la formación de los cuerpos apoptóticos (Kerr JFR, 1972). Estos cuerpos, son fragmentos de citoplasma con orgánulos que han quedado dentro con su membrana intacta, con o sin fragmentos nucleares. Finalmente, estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos y degradados en los fagolisosomas, sin estimular ninguna reacción inflamatoria (Elmore, 2007).

La inducción y ejecución de la apoptosis requiere la cooperación de un amplio número de moléculas, incluyendo moléculas señalizadoras, receptores, enzimas y proteínas reguladoras de la expresión génica. Entre ellas, la cascada de señalización de caspasas, regulada por varias moléculas como las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y la familia de proteínas Bcl-2, es esencial durante este proceso (Launay *et al.*, 2005).

Las caspasas pertenecen al grupo de proteínas cisteínproteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Éstas se sintetizan como pro-enzimas inactivos (zimógenos), con actividad nula, y se activan por autocatálisis o por acción de otra proteasa mediante un corte específico en un residuo de aspartato (Cohen, 1997). Durante la muerte celular, las caspasas son procesadas pasando de una pro-forma inactiva a un enzima activo, responsable de la mayoría de cambios morfológicos y bioquímicos propios de la apoptosis. Las caspasas se pueden clasificar en tres familias: a) la subfamilia ICE (*interleukin-1 β -converting enzyme-like proteases*), dentro de la cual se encuentran las caspasas -1, -4 y -5; b) la subfamilia CED-3/CPP32 (*32kDa cistein protease*), donde se encuentran la mayoría de ellas, como son las caspasas -3, -6, -7, -8, -9 y -10; y por último, c) la subfamilia ICH-1/Nedd2, al que pertenece la caspasa-2.

Existen dos rutas diferentes a través de las cuales la familia de caspasas puede ser activada: extrínseca o intrínseca (Figura 8) (Filén and Lahesmaa, 2010), aunque también existe una forma de apoptosis intrínseca independiente de la activación de caspasas (L Galluzzi et al. 2012).

4.2.1 Vía extrínseca o dependiente de los receptores de muerte

Es una vía de muerte celular inducida por señales de estrés extracelulares que son recibidas y propagadas por receptores transmembrana específicos. Este tipo de apoptosis puede ser iniciada por la unión de ligandos, como el ligando FAS/CD95 (FASL/CD95L), TNF α y TRAIL; a sus respectivos receptores de muerte, como son FAS/CD95, receptor de TNF (TNFR) y receptores de TRAIL (DR4 y DR5). Alternativamente, la señal pro-apoptótica extrínseca puede ser mediada por los llamados “receptores dependientes”, como por ejemplo los receptores de netrina, que únicamente exhiben funciones letales cuando la concentración de sus ligandos específicos se encuentra por debajo de un umbral crítico (Galluzzi *et al.*, 2012).

Dentro de la vía extrínseca encontramos dos variantes (Fan *et al.*, 2005):

-Dependiente de la activación de las caspasas iniciadoras -8 y -10. Las señales de muerte son específicamente reconocidas por sus respectivos receptores de muerte en la membrana plasmática, provocando su activación, mediante la formación de un complejo de señalización inductor de muerte (*death-inducing signaling complex*, DISC). En células del tipo I (algunas células linfoides), la caspasa-8 es fuertemente activada y es capaz de activar por sí sola el resto de pro-caspasas (ej, caspasa efectora-3). Sin embargo, en células del tipo II (resto de células), la caspasa-8 es incapaz de activar la pro-caspasa-3 por sí sola y necesita activar la vía intrínseca, mediante la activación de Bid, que permitirá su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación de la mitocondria de proteínas como citocromo c, factor inductor de apoptosis (AIF) y otras moléculas, y la consecuente activación de la vía intrínseca mitocondrial.

-Dependiente de la activación de la caspasa-2. Los receptores activos reclutan a la pro-caspasa-2 mediante proteínas adaptadoras, como el *receptor-*

interacting protein (RIP), con el *death domain* (DD) y TRADD; activándose así la caspasa-2, que conllevará a la activación de las caspasas efectoras-3, -6 y -7 (Figura 7).

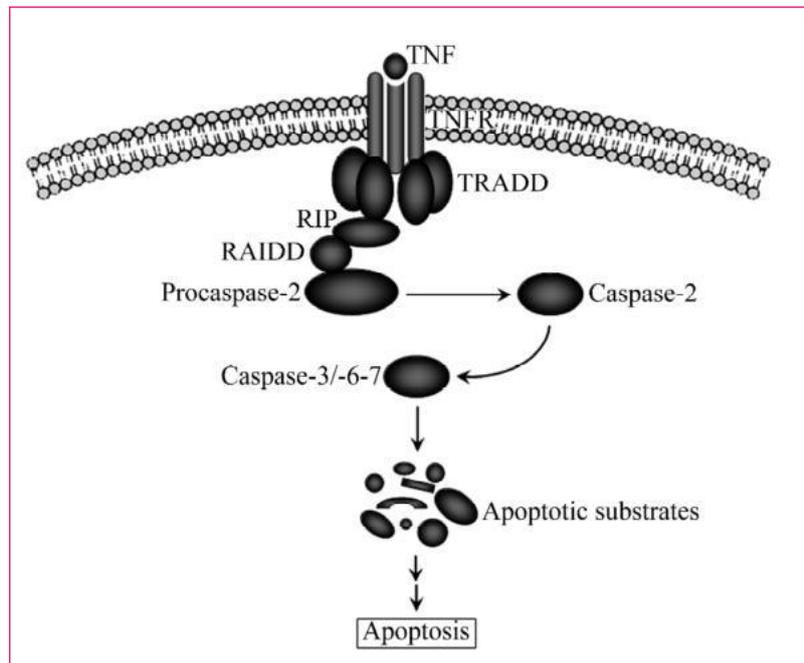


Figura 7. Activación de la vía extrínseca dependiente de la activación de la pro-caspasa-2. Las proteínas RIP, TRADD y TNF, se asocian con el receptor de muerte. Esta asociación, conllevará a la activación de la caspasa-2 y la consecuente ejecución de la apoptosis, mediante las caspasas efectoras-3, -6 y -7 (Fan *et al.*, 2005).

4.2.2 Vía intrínseca o mitocondrial

Esta ruta se inicia en respuesta a diversos estímulos como por ejemplo, radiación ultravioleta o gamma, daño en el DNA, drogas quimioterapéuticas, estrés oxidativo, acumulación de proteínas mal plegadas; entre otros. Frecuentemente, junto con la señal de propagación de la cascada de señalización pro-apoptótica, se ven también involucrados los mecanismos anti-apoptóticos con el fin de contrarrestar los efectos de estrés en las células. Así pues, ambas señales pro y anti-apoptóticas convergen en las membranas mitocondriales, que se permeabilizarán cuando la primera señal predomine sobre la segunda (Kroemer *et al.*, 2007; Kirkin *et al.*, 2004). Cuando las células ya no pueden evitar el daño al DNA, tras una señal de estrés se

producen cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP) que permite la salida hacia el citosol de diversas proteínas que se encuentran en el espacio intermembrana (IMS), como es el caso del citocromo c. Los poros de la membrana los forman proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, como son Bax y Bak. Este citocromo c liberado al citosol oligomeriza con Apaf-1 (*apoptotic protease activation-factor-1*), con la pro-caspasa-9 y dATP (*deoxyadenosine triphosphate*) formándose así un complejo llamado apoptosoma. Este complejo será capaz de activar la caspasa-9, la cual a su vez activará las caspasas efectoras -3, -6 y -7, provocando la muerte celular (Figura 8) (Fan *et al.*, 2005).

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, en las células de tipo II, la vía mitocondrial se conecta a la vía extrínseca mediante el corte y activación de Bid, el cual provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consecuente activación de caspasa-9, dando lugar a la amplificación de la señal. También se ha descrito que puede tener lugar la activación de la vía intrínseca de una forma independiente de las caspasas. La MOMP permite que proteínas como AIF (*Apoptosis-inducing factor*) o EndoG (*endonuclease G*) se transloquen al núcleo y fragmenten el DNA provocando la muerte de la células (Galluzzi *et al.*, 2012). Esta vía independiente de la activación de las caspasas varía según las condiciones fisiológicas, patológicas y experimentales.

Debido a que las caspasas son enzimas proteolíticos, una vez han sido activadas pueden cortar una gran variedad de proteínas. Por ejemplo, durante las fases iniciales de la apoptosis, la caspasa-3 es la responsable de cortar a la Poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), reduciendo así su actividad reparadora de daño al DNA y conduciendo a la muerte de las células (Martin and Green, 1995). Por otra parte, las caspasas también son responsables de activar selectivamente a un grupo restringido de proteínas, que se encargan de cortar el DNA (nucleasas) en diversos fragmentos. Estas nucleasas cortan el DNA genómico entre nucleosomas, generando fragmentos de DNA con una longitud aproximada de 180 pares de bases (*DNA ladder*). Al inicio se describió que la responsable de estos cortes era la endonucleasa CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*) que se encuentra en las células en una forma inactiva, debido a su unión a una subunidad inhibitoria, ICAD (*inhibitor of CAD*). La activación de CAD tiene lugar mediante el corte proteolítico de la subunidad inhibitoria ICAD (Hengartner, 2000; Sakahira *et al.*, 1998). Recientemente, se ha

descrito la participación de otra nucleasa en colaboración con CAD, la endonucleasa del retículo endoplasmático DNAS1L3 (Errami *et al.*, 2013).

Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores, ya que se ha observado que la desregulación aparece solamente en células cancerígenas y no en células normales (Korsmeyer, 1992). Por este motivo, las terapias que directamente activan el mecanismo de apoptosis tienen el potencial de inducir muerte celular en cánceres con un amplio espectro de resistencia frente a las terapias convencionales (radio/quimioterapia), que se centran únicamente a nivel de replicación del DNA o división celular.

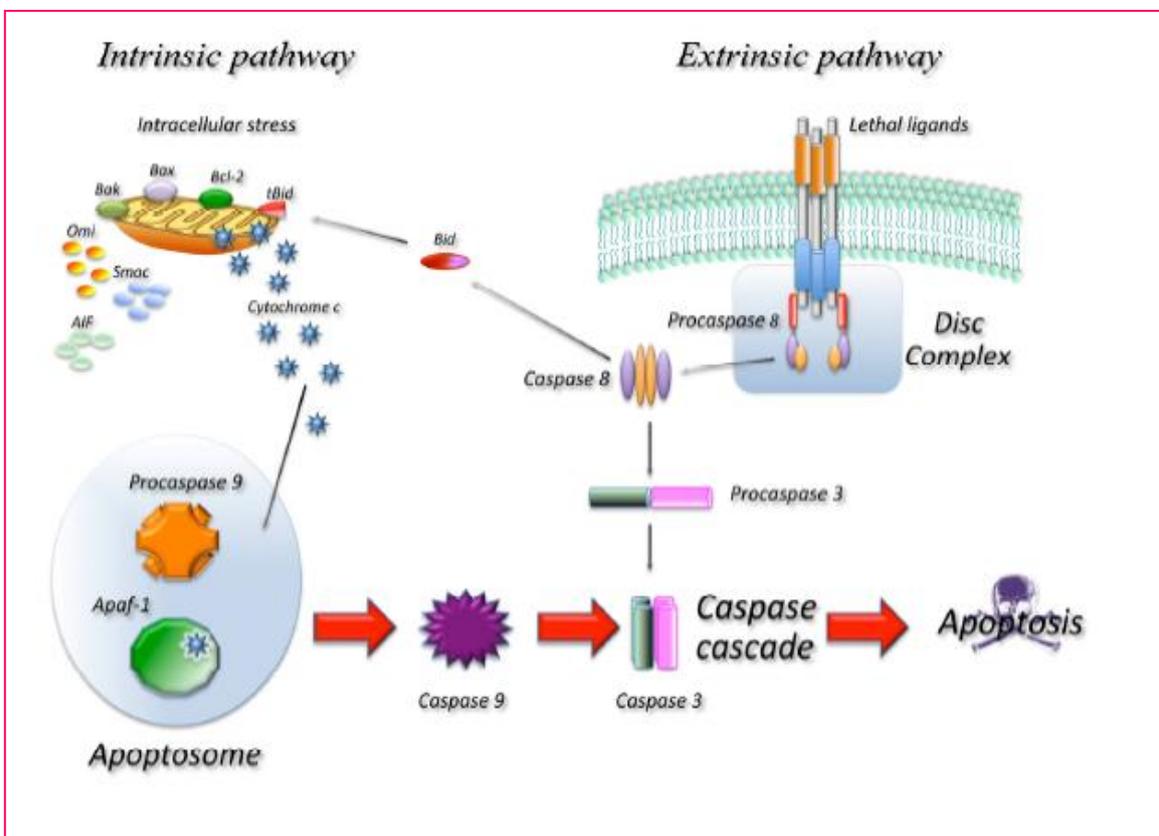


Figura 8. Esquema de las principales rutas moleculares que conducen a la apoptosis (extrínseca o intrínseca). En la ruta extrínseca, tras la unión específica de los ligandos a sus respectivos receptores, tiene lugar la formación del complejo DISC y la posterior activación de la caspasa-8, que activará directamente las caspasas efectoras -3, -6 y -7, o activará la vía intrínseca mediante la activación de Bid. Por otro lado, en la ruta intrínseca, la señal de estrés celular provocará la permeabilización de la membrana mitocondrial y la consecuente salida del citocromo c al citosol, que resultará en la formación del apoptosoma y activación de la caspasa-9. En ambas rutas, el resultado final será la activación de las caspasas efectoras -3, -6 y -7, y la consecuente muerte celular (Favaloro *et al.*, 2012).

4.3 Autofagia

La autofagia es un proceso, presente en todas las células eucariotas, por el cual se eliminan moléculas y orgánulos intracelulares en los lisosomas. Este mecanismo, en condiciones normales, favorece el mantenimiento u homeostasis celular. Sin embargo, en condiciones microambientales adversas (estrés celular por falta de nutrientes, infección por patógenos, etc) es una respuesta para la supervivencia de las células. Además, existe un nivel basal de autofagia en células no estresadas que actúa como mecanismo de control de calidad en la célula, eliminando así aquello que resulte defectuoso (malformaciones celulares internas).

Existen principalmente dos tipos de autofagia, microautofagia y macroautofagia. La primera, se define como la absorción del citoplasma dentro del lisosoma o de una vacuola (este último sólo descrito en levaduras). El segundo tipo, se caracteriza por presentar catálisis de proteínas y componentes celulares como una estrategia de supervivencia en condiciones adversas, por ejemplo, de baja disponibilidad de nutrientes.

Las vacuolas autofágicas se forman inicialmente a partir de las membranas del retículo endoplasmático. Esta estructura forma una doble membrana que se fusiona con endosomas tardíos y lisosomas, generando una estructura conocida como autofagolisosoma, donde finalmente se degradan los orgánulos que habían sido previamente autofagocitados. Es por ello, que un indicador morfológico de la presencia de macroautofagia es la acumulación de autofagosomas y autolisosomas.

Se ha demostrado en varias investigaciones, que algunas terapias contra el cáncer son capaces de inducir autofagia en diferentes tipos de células cancerígenas. Sin embargo, todavía no está claro, si la autofagia es una respuesta que promueve la supervivencia o la muerte de las células tras la terapia (Kondo and Kondo, 2006). Uno de estos ejemplos de terapia anti-cancerígena es el uso del agente alquilante, TMZ. Inicialmente se demostró que TMZ inducía apoptosis en células de glioma (Roos *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha observado que TMZ también puede inducir autofagia en las mismas líneas celulares, sugiriéndose que este proceso es el responsable de la citotoxicidad causada por TMZ. Se ha observado además que la inhibición de MGMT, así como la inhibición de Rad51 (proteína involucrada en recombinación homóloga, HR) promueven el proceso de autofagia. Por lo tanto, estos resultados sugieren que

TMZ puede inducir autofagia y que este proceso puede ser inhibido por la expresión de MGMT y la proteína de reparación del DNA, Rad51. Además se ha observado que el proceso de autofagia precede a la apoptosis y sirve como un mecanismo de supervivencia para las células tumorales, ya que inhibe la apoptosis inducida por TMZ (Knizhnik *et al.*, 2013).

4.4 Catástrofe Mitótica

En los últimos años se ha intentado definir y clasificar este fenómeno para establecer si era considerado como un tipo de muerte diferenciado, si era igual que la necrosis o la apoptosis, o bien, si precedía de alguna de éstas.

Este fenómeno, conocido como catástrofe mitótica (*MC, mitotic catastrophe*), se define como un proceso que tiene lugar cuando las células intentan dividirse sin haber reparado correctamente los daños del DNA o bien cuando hay problemas en los microtúbulos. Cuando hay daño en el DNA o éste no se ha replicado correctamente, interviene el punto de control G2/M. Éste es el encargado de parar las células en esta fase para intentar reparar los fallos y, cuando los cromosomas no se encuentran debidamente adheridos al huso acromático para su segregación, es el punto de control de la metafase el que se encarga de que no se progrese a la siguiente fase (anafase). Sin embargo, cuando los puntos de restricción del ciclo celular no funcionan correctamente o se encuentran inhibidos, las células entran forzosamente en mitosis sin haber reparado los daños del DNA. Por lo tanto, es la combinación de estos factores, daños al DNA no reparados junto con las diferentes deficiencias que pueda haber en los puntos de control, la que determinará que estas células mueran por catástrofe mitótica (Figura 9) (Castedo *et al.*, 2004 a).

Una de las características morfológicas más destacada de la MC es la formación de células gigantes multinucleares con cromosomas condensados, haciendo fácil distinguir morfológicamente la MC de otros modos de muerte celular (Singh *et al.*, 2010). Inicialmente, la formación de estas células gigantes se explicaba por varios mecanismos que incluían: fusión de las células hijas tras la división celular o división celular anormal, o por una combinación de ambos. Sin embargo, recientemente se ha visto que la formación de células gigantes como resultado de la MC no es una

consecuencia de la fusión de células hijas, sino que podría ser el resultado de la fusión de células mitóticas con células interfásicas en fase S o G₂. Para que esta fusión se pueda llevar a cabo, tiene que haber una distribución asimétrica de los cromosomas en la metafase, dando lugar a células hijas con diferentes tamaños y con una diferente dotación cromosómica (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008). La segunda hipótesis es que estas células gigantes se forman como consecuencia de repeticiones consecutivas de la fase S antes de entrar en mitosis o endoreplicación en un estado poliploide. Por otro lado, se ha visto que, aunque la endoploidía parece ser el principal mecanismo de la formación de células gigantes, la primera causa podría ser el desacoplamiento de la síntesis de DNA durante la división celular (*endocycling*), y no la endoreplicación como se proponía anteriormente (Erenpreisa *et al.*, 2005).

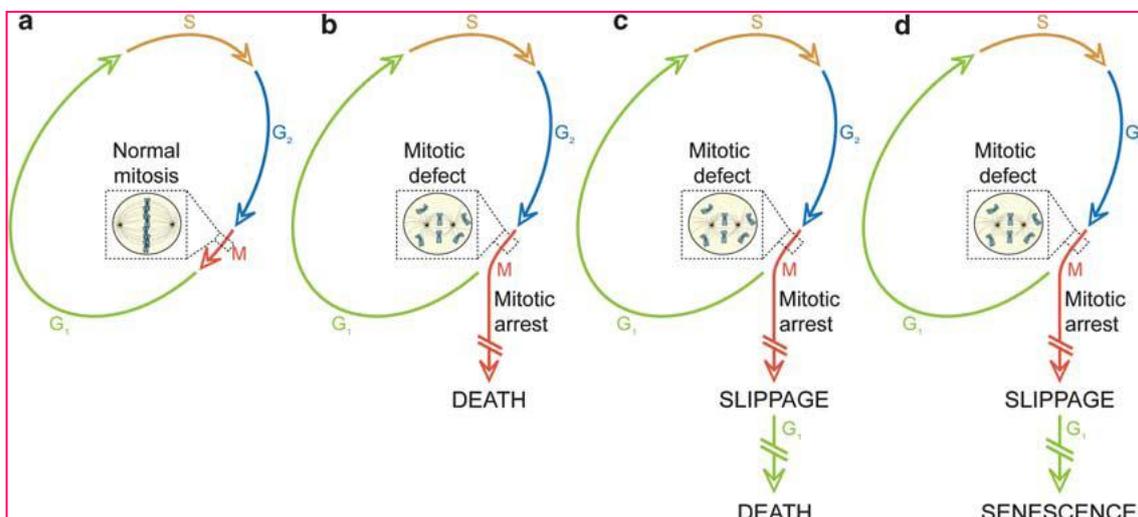


Figura 9. La catástrofe mitótica se desencadena por el desajuste en el aparato mitótico, iniciándose en fase M del ciclo celular, y es paralela a algún tipo de parada mitótica que finalmente desencadenará la muerte celular o senescencia. **A)** Ciclo celular normal, generando células diploides. **B-D)** cuando hay un problema que afecta al funcionamiento de la maquinaria de la mitosis, se produce una parada mitótica para la activación de la catástrofe mitótica. Existen dos destinos diferentes: **B)** muerte directa de la célula. **C)** Cuando la parada mitótica se prolonga, las células salen de la mitosis y cuando lleguen a la fase G₁ morirán (*mitotic slippage*). **D)** las células salen de mitosis y al llegar a la fase G₁ entran en senescencia (Galluzzi *et al.*, 2012).

Todavía no está claro si este tipo de muerte es dependiente o independiente de la activación de caspasas. De hecho, estudios realizados en células de pulmón han revelado que la activación de caspasas no parece ser un factor decisivo en la inducción

de muerte celular por catástrofe mitótica (Mansilla *et al.*, 2006). Por otro lado, hay estudios que demuestran que la MC es diferente de la apoptosis porque cuando se inactiva la expresión de proteínas de la maquinaria apoptótica, se reduce la muerte por apoptosis, mientras que se ve aumentada la frecuencia de muerte por MC. Además, se ha visto que el uso de inhibidores de caspasas fallan en la prevención de la aparición de células gigantes multinucleares (Nabha *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha asociado la MC inducida por un inhibidor de Chk-2 (*cell-cycle checkpoint kinase-2*), el *debromohymenialdisine* (DBH), con la liberación mitocondrial de citocromo c, la activación de caspasa-3 y la consecuente fragmentación de DNA. Así pues, estos resultados parecen indicar que la muerte por catástrofe mitótica presenta características fundamentales de la apoptosis como son permeabilización de la membrana mitocondrial externa, activación de caspasas y fragmentación de DNA (Castedo *et al.*, 2004 b). Por ello, Castedo *et al.* concluyeron que en la muerte por catástrofe mitótica al menos una caspasa debe de ser activada a nivel pre-mitocondrial.

Recientemente, se ha relacionado la caspasa-2 con muerte celular inducida por mitosis aberrantes en células cancerígenas y con muerte celular por mitosis anormales inducidas por agentes que afectan a los microtúbulos (Ho *et al.*, 2008; Castedo *et al.*, 2004 b; Fava *et al.*, 2012). La caspasa-2 es la caspasa más conservada evolutivamente y, sin embargo, su papel en apoptosis es todavía una incógnita. Se considera una caspasa iniciadora puesto que, aunque comparte especificidad por sustratos con las caspasas efectoras, se activa mediante dimerización. Además se ha visto que, aunque la activación de la caspasa-2 puede inducir apoptosis bajo determinadas circunstancias, su activación no induce obligatoriamente apoptosis, sino que puede que tenga otras funciones reguladoras, que todavía se desconocen. La expresión de la caspasa-2 parece estar muy regulada durante el ciclo celular y es reprimida durante la mitosis normal. Esta represión tiene lugar mediante la fosforilación del residuo de Serina 340 (localizado en el dominio de unión de las subunidades grande y pequeña de la caspasa-2). El complejo formado por la quinasa cdc2-ciclinaB1 es el encargado de fosforilar la caspasa-2 en este residuo, mientras que la fosfatasa PP1 (*protein phosphatase 1*) facilita su defosforilación durante la interfase. Sin embargo, se ha observado que un fallo en la fosforilación de la caspasa-2 durante la mitosis induce su activación y la posterior muerte celular (Bouchier-Hayes and Green, 2012). Además, se ha demostrado que algunos agentes pueden inducir catástrofe mitótica, resultando en la activación de caspasa-2, lo cual promueve la permeabilización de la membrana mitocondrial, con la

consecuente liberación de citocromo c, activación de caspasa-3 y apoptosis nuclear (Castedo *et al.*, 2004 b). Sin embargo, los mecanismos exactos de MC son todavía inciertos, ya que también puede ser llevada a cabo por mecanismos independientes de la activación de caspasas.

Por otro lado, se ha sugerido que algunas drogas anti-tumorales pueden inhibir proteínas que controlan la mitosis, contribuyendo así a una división nuclear anormal y la consecuente muerte celular, al menos en varios tipos celulares (Portugal *et al.*, 2010). Una forma de conocer qué está ocurriendo en células que mueren por MC es analizando la expresión de genes involucrados en mitosis y compararlo con mitosis normales (células no tratadas). Sin embargo, los cambios en la expresión de determinados genes no pueden considerarse como marcadores de MC, ya que se pueden producir cambios similares durante la progresión del ciclo celular.

5. Mantenimiento de la Integridad del DNA

En cada proceso de replicación y transcripción del DNA, están implicadas numerosas actividades tanto enzimáticas como reguladoras. A estos sistemas hay que añadir muchas enzimas que interaccionan con el DNA para modificar su estructura o para reparar posibles daños que hayan sufrido a lo largo de estos procesos. Así pues, las células han desarrollado una extensa red de rutas que actúan juntas para detectar y señalar daños producidos en el DNA para evitar la propagación de posibles mutaciones que producen inestabilidad genómica y conducen al cáncer. La detección del daño al DNA y su señalización se lleva a cabo por la vía *DNA Damage Response* (DDR), cuya función es crucial para el mantenimiento de la integridad genómica.

5.1 Puntos de control del ciclo celular

Los puntos de control, conocidos como *checkpoints*, son eventos moleculares encargados de mantener la fidelidad de la división celular. En estos puntos, se verifica si las actividades en cada fase del ciclo celular se han completado correctamente antes de progresar a la siguiente fase, evitando así que eventos como daños al DNA puedan continuar a lo largo del ciclo. La parada del ciclo celular para la reparación de daños es un proceso complicado formado por la regulación de diversas proteínas. Esta regulación está controlada principalmente por dos miembros de la familia PIKK (*phosphoinositide 3-kinase-related kinase*) como son ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) y ATR (*AT Rad3-related*). Cuando las células sienten que se ha producido daño al DNA, estas proteínas activan una cascada de fosforilaciones poniendo así en marcha los puntos de control del ciclo celular para evitar que estos daños puedan progresar (Figura 10) (Alexander *et al.*, 2012).

Punto de restricción G1/S. Está regulado por p53 y evita la replicación del DNA dañado. Cuando se detecta algún tipo de daño, la quinasa ATM fosforila p53 para activarlo, aumentando su capacidad de unión al DNA. Para que las células se paren en este punto, p53 activa la transcripción de ciertos genes, entre ellos, el inhibidor de las

ciclinas dependientes de quinasas (cdks), p21, que se une a los diferentes complejos cdk-ciclina, inhibiendo su actividad e impidiendo la progresión a la fase S. Además, p53 es un activador de la vía apoptótica en el caso de que sea necesario eliminar las células dañadas (Mirzayans *et al.*, 2012).

Punto de restricción G2/M. Para empezar, es necesario que las proteínas quinasas, Chk1 y Chk2, sean capaces de inhibir a las diversas isoformas de cdc25, que son fosfatasas que hidrolizan la fosforilación inhibitoria de los complejos ciclina-cdks. Además, Chk1 es capaz de activar la tirosina quinasa Wee1, que fosforila y, en consecuencia, inhibe el complejo ciclinaB-cdk1 en la transición G2/M del ciclo celular para que las células sean capaces de reparar los daños existentes en el DNA (Domínguez-Kelly *et al.*, 2011).

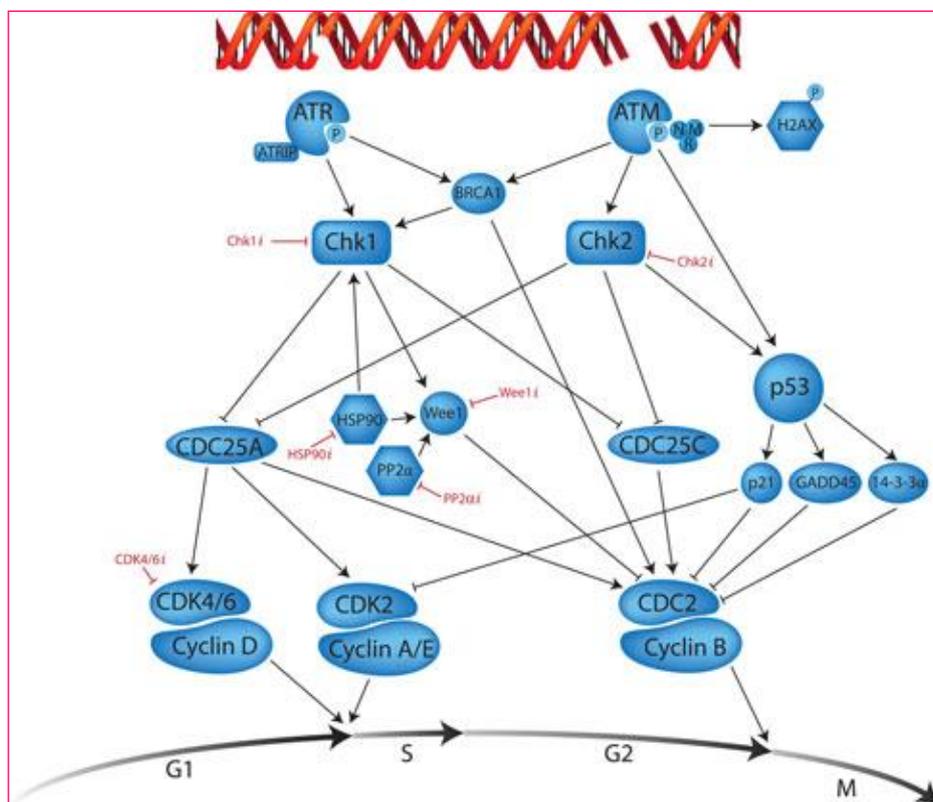


Figura 10. Resumen de los puntos de control a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular. Se indican las moléculas más importantes y sus relaciones en el control del ciclo celular. Las posibles dianas terapéuticas están remarcadas en rosa (Chk1, CDK4/6, HSP90, PP2 α , Wee1 y Chk2) (Alexander *et al.*, 2012).

Muchos de los tratamientos convencionales contra el cáncer producen daños en el DNA. Debido a que no son específicamente selectivos contra las células tumorales,

los pacientes han sufrido durante años los efectos secundarios de estas drogas. Por ello, uno de los mayores retos es conseguir una estrategia terapéutica que esté dirigida únicamente a estas células tumorales.

Los investigadores del cáncer examinaron los mecanismos oncogénicos en eucariotas superiores utilizando las mismas técnicas de biología molecular que los investigadores del ciclo celular (levadura, hongos, oocitos de anfibios), revelándose así que muchas células cancerígenas tienen deficiencias en el punto de control G1 y que, por tanto, dependen más del punto de control G2 que las células normales. Combinando las dos corrientes de investigación, apareció el término de “invalidación del punto de control G2” como una táctica para el desarrollo de medicinas específicas contra estas células tumorales. Para conseguir una selectiva abolición del punto de restricción G2 con efectos mínimos sobre las células normales, la molécula dirigida a este punto de control no debe estar involucrada en otros procesos como punto de control G1 y S, y los implicados en la reparación del DNA (Kawabe, 2004).

5.2 Daño al DNA

El daño al DNA se considera como el conjunto de cambios en su estructura que conducen a alteraciones en la replicación y/o transcripción, con la consecuente alteración de la viabilidad celular. Los agentes que provocan daño pueden ser divididos en dos subcategorías: **a) químicos**, como son análogos de bases, agentes alquilantes y agentes intercalantes y; **b) físicos**, entre los que se encuentran radiación UV, radiación ionizante y calor, entre otros. Son numerosos los tipos de daño que puede sufrir el DNA: mal emparejamiento de bases (*missmatch*), desaminación, pérdida de bases, unión covalente entre bases de la misma cadena, unión de grupos alquilo, ruptura de cadena simple (*single strand break*, SSB) o ruptura de doble cadena (*double strand break*, DSB), entre otros. Si finalmente este daño no es reparado, puede llevar al envejecimiento, muerte celular o mutaciones que pueden producir una proliferación incontrolada y la formación de tumores.

La activación de la vía de reparación del DNA dañado (DDR) induce una parada del ciclo celular, reparación del DNA, activación de un programa transcripcional y, cuando las lesiones son graves, la muerte celular. La eficiencia de la reparación a este

daño es complicada ya que el DNA genómico se encuentra compactado formando la cromatina junto con proteínas histonas y no-histonas. Por lo tanto, la estructura de la cromatina juega un papel muy importante en esta respuesta DDR, ya que dependerá de lo accesible que se encuentre en el momento del daño a diferentes proteínas que sean activadas, tanto de la maquinaria de reparación como otros tipos de proteínas. Existen diferentes mecanismos que permiten manipular directamente el estado de la cromatina como son: modificaciones covalentes de las histonas, incorporación de variantes de histonas y por último, la remodelación de la cromatina dependiente de ATP manipulándola físicamente (alterando o reubicando los nucleosomas).

Las histonas son proteínas que se agrupan en octámeros formando los nucleosomas (unidad básica de la cromatina). Los aminoácidos expuestos al exterior del octámero son, lisinas, argininas, serinas y treoninas. Estos aminoácidos son los que se modificarán post-traduccionalmente y, en el caso de la activación de la vía DDR, las modificaciones más comunes son las poliADP-ribosilaciones, fosforilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, metilaciones y sumoilaciones (Lukas *et al.*, 2011). La más estudiada de todas es la fosforilación en la Serina 139 del extremo C-terminal de la histona H2AX (Costelloe *et al.*, 2006).

5.2.1 Tipos de daño: rotura de simple cadena (SSB) y rotura de doble cadena (DSB)

5.2.1.1 **Rotura de simple cadena.**

Dentro de los tipos de daño que existen, la rotura de una sola hebra de DNA es una de las lesiones más comunes, alcanzando cifras de aproximadamente decenas de miles por célula por día. Este tipo de lesión puede ocurrir como consecuencia de un ataque directo de metabolitos intracelulares o de la degradación espontánea del DNA.

5.2.1.2 **Rotura de doble cadena.**

La rotura de la doble cadena del DNA representa una de las lesiones genómicas más peligrosas, ya que se trata de una lesión que no deja ninguna hebra complementaria intacta a partir de la cual poder reparar el daño utilizándola como molde. La complejidad de este tipo de lesión radica en que si no es reparada puede

resultar en muerte celular y si la reparación es errónea puede causar translocaciones cromosómicas, que es una etapa inicial en la etiología de la carcinogénesis (Jeggo and Löbrich, 2007). En general, se considera que el agente externo más significativo que puede inducir DSB es la radiación ionizante, aunque también puede ser inducida por ciertos fármacos.

Los DSBs se pueden formar indirectamente por varios procesos como son: dos roturas de simple cadena (*single strand break*, SSB) que se encuentran muy cerca, o bien durante la reparación de otras lesiones cuando hay un colapso en la horquilla de replicación. De hecho, la rotura de doble cadena al DNA se puede considerar como la última lesión inducida por un amplio rango de agentes que lo dañan.

La respuesta de daño a la formación de DSB en el DNA comprende varias vías que incluyen una de reparación de estos DSBs y otras rutas encargadas de transducir la señal para promover la parada del ciclo celular (por medio de los puntos de control) y/o activación de la apoptosis. Además en los últimos años han ido aumentando las evidencias que sugieren que la señalización de la respuesta de daño, se comunica con la maquinaria de reparación de DSB, regulando así algunos aspectos relacionados con la reparación de este tipo de lesión (Deckbar *et al.*, 2007).

En esta respuesta DDR existen dos proteínas que se encuentran en el centro de la vía de señalización más significativa como respuesta a DSB: la PIKK (*phosphoinositol-3-kinase like kinase*) y la ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) (Wyman and Kanaar, 2006). La señalización dependiente de ATM es un proceso complejo que implica a proteínas sensoras, que reconocen el daño y facilitan la activación de proteínas mediadoras de ATM, que a su vez sirven para amplificar la señal de ATM; y proteínas quinasas transductoras, que se encargan de transmitir la señal de ATM a proteínas efectoras que actuarán ya sea induciendo parada del ciclo celular (activación de los puntos de control), apoptosis o reparación del DNA.

Uno de los puntos importantes en este mecanismo DDR, es cómo ATM es activado y cómo siente la célula que se ha producido DSB en el DNA. Aquí es donde entra el papel del complejo formado por tres proteínas Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN). Se ha sugerido que MRN es el primer sensor de formación de DSB, y no la propia ATM; y este complejo es requerido para la activación de ATM (Figura 11) (Uziel *et al.*, 2003). Además se ha sugerido que el complejo MRN tiene un gran impacto en la activación de la señalización de ATM tanto vía arriba como vía abajo, sugiriéndose que tiene un papel como sensor, pero también potencialmente como proteína

mediadora. Por último, recientemente se ha descrito que algunos de los componentes de la señalización de ATM sirve para modificar la estructura de la cromatina para facilitar su reparación, así como también para promover la señal de daño (Jeggo and Löbrich, 2007).

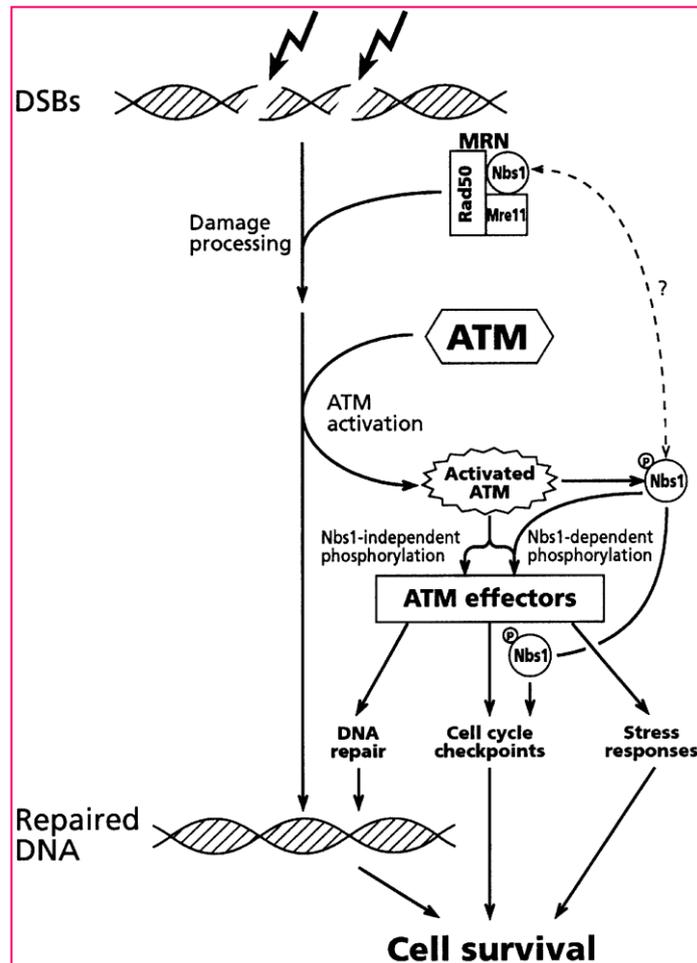


Figura 11. Modelo de los eventos que tienen lugar en la respuesta celular para moderar los niveles de DSB en el DNA. El complejo MRN es esencial en las primeras etapas del DDR. El procesamiento de las lesiones del DNA conlleva el reclutamiento y activación de ATM, que fosforila sus sustratos, entre los que se encuentran Nbs1 y Mre11. Una vez fosforilado, Nbs1 facilita la fosforilación de ciertos sustratos de ATM y tiene un papel importante en la activación de los puntos de control del ciclo celular. Todavía no está claro si Nbs1 actúa solo en esta función o en el contexto del complejo MRN (Uziel *et al.*, 2003).

-Mecanismo de Señalización de los DSBs

Uno de los descubrimientos más importante en relación con la rotura de doble cadena fue que las células fosforilan una variante de la histona H2A, la H2AX en los alrededores del DSB en el DNA, resultando en la acumulación de un variado tipo de proteínas involucradas en la reparación de este daño (Paull *et al.*, 2000). Así pues, la fosforilación de la histona H2AX, conocida como γ H2AX, se induce por los DSB y se utiliza como marcador universal para este tipo de daño. En concreto, la histona H2AX es fosforilada en el residuo de Serina 139 en las células cuando se forman DSB en el DNA (Rogakou, 1998).

La histona H2AX es uno de los miembros de la subfamilia de histonas H2A, una de las cinco familias de histonas que se encargan de empaquetar y organizar el DNA eucariota en la cromatina (Bonner *et al.*, 2008). Esta histona comprende entre 2-10% del total de histonas H2A en tejidos de mamíferos y está presente en mayor proporción en eucariotas inferiores, por ejemplo, en levadura, la H2AX constituye prácticamente el total de H2A.

Aunque el mecanismo de acción no esté claro del todo y todavía se discute si el mecanismo de fosforilación de la histona H2AX es dependiente o independiente de la acción de unas proteínas u otras, lo que sí está claro es que la γ H2AX es necesaria para que una serie de proteínas y factores sean reclutados al lugar dañado. Como ya hemos mencionado en el apartado anterior, el DSB es reconocido por el complejo MRN, el cual recluta a ATM, que es la primera proteína encargada de fosforilar la histona H2AX, aunque también participen otras quinasas. Esta fosforilación es reconocida por el mediador del punto de control de daño al DNA (*mediator of DNA damage checkpoint*, MDC1), el cual se une a la histona promoviendo la adhesión de más moléculas MRN-ATM para crear un *loop* de fosforilaciones de 1Mb a un lado y otro del DSB. Finalmente, la acumulación de ATM en el lugar dañado provocará la activación de las quinasas efectoras Chk1 y Chk2, que se encargarán de extender la señal en el núcleo, donde se activará una cascada de señalización que incluirá la activación de factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, apoptosis y factores de reparación de DNA, entre otros (Figura 12) (Polo and Jackson, 2011; Podhorecka *et al.*, 2011; Banerjee and Chakravarti, 2011). Por todas estas observaciones ha quedado demostrado que la formación de γ H2AX es una respuesta celular rápida y sensible a la presencia de

DSB en el DNA, una respuesta que puede dar una idea del orden en la estructura de la cromatina (Baxevanis and Landsman, 1996).

Una vez los DSBs han sido reparados, los focos formados por γ H2AX desaparecen. En cuanto a la eliminación de la fosforilación de H2AX tras la reparación del DNA, se han llevado a cabo diversos estudios en los cuales se ha sugerido que puede tener lugar mediante dos mecanismos no exclusivos: defosforilación de γ H2AX o eliminación de γ H2AX de la cromatina (Svetlova *et al.*, 2010). La defosforilación se ha relacionado con las fosfatasas PP2A (*protein phosphatase 2A*), PP4C (*protein phosphatase 4C*) y Wip1, que presenta homología por las PP2C (Chowdhury *et al.*, 2005, 2011; Fiscella *et al.*, 1997). Mientras que la eliminación de γ H2AX de la cromatina por intercambio de histona se ha visto en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Drosophila melanogaster* durante la remodelación de la cromatina (van Attikum, 2005; Kusch *et al.*, 2004).

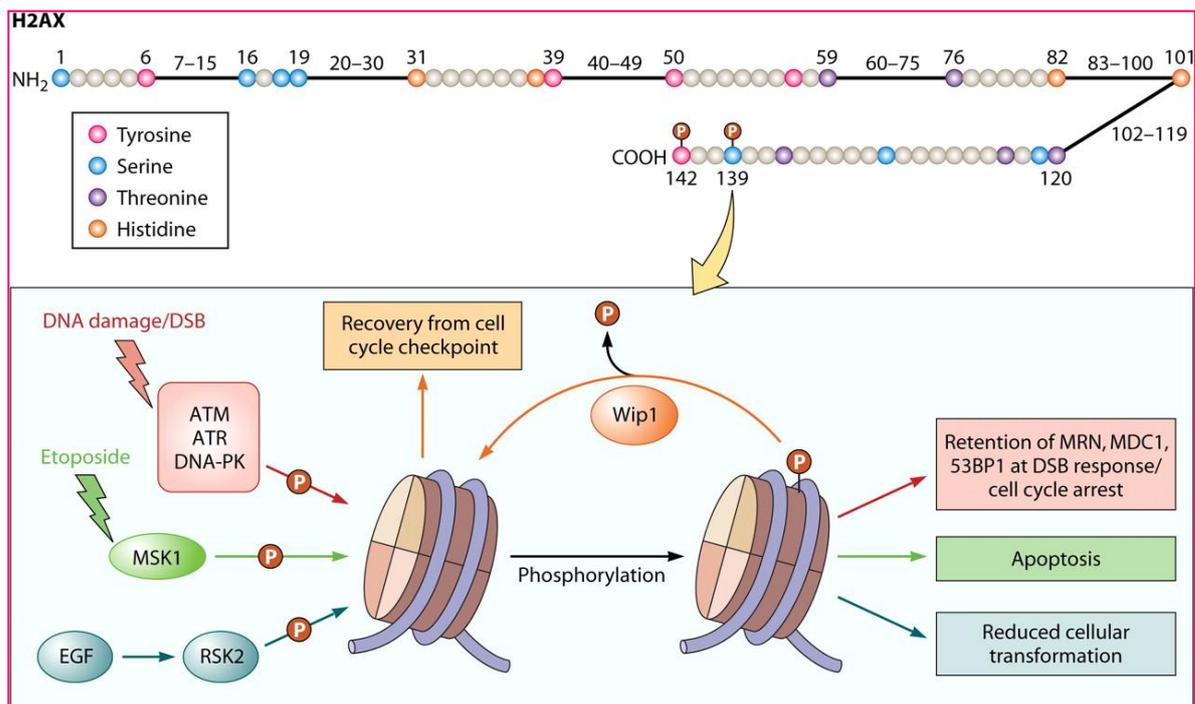


Figura 12. En la parte de arriba, se muestra la estructura de la histona H2AX en humanos donde aparecen todos los residuos de serina, treonina, tirosina e histidina. En la parte de abajo, encontramos los eventos que tiene lugar cuando la H2AX es fosforilada en el residuo de serina 139 en células de mamífero cuando se ha producido daño al DNA (DSB) (Banerjee and Chakravarti, 2011).

5.2.2 Endonucleasas responsables de la fragmentación del DNA

Como ya hemos comentado en el apartado de muerte celular, la apoptosis se caracteriza por condensación de la cromatina, activación de caspasas y fragmentación del DNA en sitios de unión internucleosomales dando lugar a la formación de múltiples bandas de aproximadamente 180-200 pares de bases (Savill, 1994). Esta forma de degradación de DNA se ha visto principalmente durante la apoptosis pero las excepciones también existen. Una de las características de la apoptosis es la digestión del DNA genómico por las endonucleasas, generando un escalera con pequeños fragmentos de DNA de doble hélice. La fragmentación del DNA inducida durante la apoptosis no se debe a enzimas que cortan la doble hélice de DNA, como se había postulado anteriormente, sino que es el resultado de los SSB. Estos cortes aseguran la separación de la molécula de DNA en los sitios donde aparecen cortes que se encuentran relativamente próximos (Peitsch *et al.*, 1993).

Durante la fragmentación del DNA se pueden diferenciar básicamente dos pasos: un primer paso en el cual el DNA es cortado en fragmentos grandes de entre 50-300kb (conocido como *high molecular weight fragmentation*, HMWF), que seguidamente son cortados en pequeños oligonucleosomas (*low molecular weight fragmentation*, LMWF) en algunas células, pero no todas. Significativamente, sólo el primer paso se considera esencial para la muerte de las células (Higuchi, 2003).

Las DNases (*DNA digesting enzymes*) son las responsables de cortar el DNA en diferentes fragmentos. Son enzimas, localizadas principalmente en el núcleo, que atacan enlaces fosfodiéster situados en el interior de una cadena polinucleotídica, y que suelen ser específicas de cada ácido nucleico. La sensibilidad DNase es específica de regiones cromosómicas y existen diferentes tipos, detalladas a continuación:

-Endonucleasa Mus81. Es una endonucleasa altamente conservada que interacciona con las proteínas Eme1/Eme2 (*essential meiotic endonuclease 1 o 2*) para formar estructuras específicas de endonucleasa en el DNA. Tiene preferencias por las estructuras ramificadas y las estructuras *Holliday* meióticas. Se trata de una proteína nuclear, cuya expresión se incrementa en las fases S y G2 del ciclo celular, cuando las células tienen un sistema de reparación, mediante recombinación homóloga (HR), operativo. Se ha visto que la cantidad de Mus81 aumenta después

del daño al DNA y su expresión es todavía mayor en células tratadas con agentes que interfieren en la progresión de la fase S (Chen *et al.*, 2001). Además, se ha concluido que la expresión de Mus81 aumenta durante la fase S cuando las células no se han expuesto a agentes exógenos que dañan al DNA, sugiriendo así que Mus81 participa en funciones normales de la fase S. Por otro lado, se ha observado que la cantidad de Mus81 es mayor en células que tienen el genoma parcial o totalmente replicado, dando mayor importancia a la idea de que su expresión incrementa en células con un sistema de reparación HR funcional. Diversos estudios han localizado a Mus81 en el nucléolo, tanto en células dañadas como en células no dañadas, aunque todavía no se sabe el motivo, pudiendo ser únicamente una función de almacenaje (Gao *et al.*, 2003). Además, se ha visto que su función es necesaria durante la mitosis para poder procesar las horquillas de replicación colapsadas, manteniendo así la integridad del genoma (Regairaz *et al.*, 2011). Su papel es convertir la horquilla de replicación colapsada en un DSB para permitir que mediante la vía de reparación HR se repare este corte generado, restaurando así la horquilla y, por lo tanto, que se pueda seguir replicando. El hecho de que tenga una función durante esta fase, la ha relacionado estrechamente con otras proteínas reguladoras del ciclo y que mantienen la integridad del genoma. Es por ello, que Mus81 se ha relacionado con las reguladoras de los puntos de control Chk1 y Chk2 y también con Wee1, aunque el papel que juega y cómo está regulada durante el ciclo celular es todavía objeto de estudio.

Hasta el momento se conoce que Chk1 evita que Mus81 actúe sobre las horquillas de replicación para evitar los DSB y que en todo caso se procesen a partir de Rad51. No obstante, se ha visto que si el estrés se prolonga demasiado, Chk1 es inactivado y entonces es Mus81 la que lo resuelve mediante la formación de DSB. Además, se ha visto que la eliminación o inhibición de Mus81 ó Eme1 en células humanas, permite la progresión de la fase S cuando la actividad de Chk1 está comprometida. Por lo tanto, se ha concluido que la eliminación de Mus81 previene la generación de daño al DNA causado por la inhibición/depleción de Chk1, reduce los efectos de la inactivación de Chk1 en la replicación del DNA y progresión del ciclo celular, y también previene la generación de DSB cuando la actividad de Chk1 se ve comprometida (Forment *et al.*, 2011). En relación a Chk2, parece que cuando hay estrés durante la replicación, Chk2 regula negativamente a Mus81 promoviendo su disociación de la cromatina para evitar que actúe sobre la horquilla de replicación. Se cree que en ambos casos, Chk1 y Chk2, su forma de actuar sobre Mus81 es mediante

la hiperfosforilación de Eme1, pero todavía no se ha confirmado del todo (Dehé *et al.*, 2013; Kai *et al.*, 2005).

Por último, en referencia a Wee1 se ha visto que también puede regular a Mus81, ya que cuando falta la primera se activa el DDR. Sin embargo, todavía no está claro cómo interaccionan ambas proteínas. Existen dos posibles mecanismos que explicarían esta interacción: a) el bloqueo/inhibición de Wee1 promueve la desregulación de los inicios de replicación, aumentando así los sustratos sobre los que actúa Mus81, y b) Wee1 actuaría directa o indirectamente sobre Mus81 (Martín *et al.*, 2011) (Figura 13).

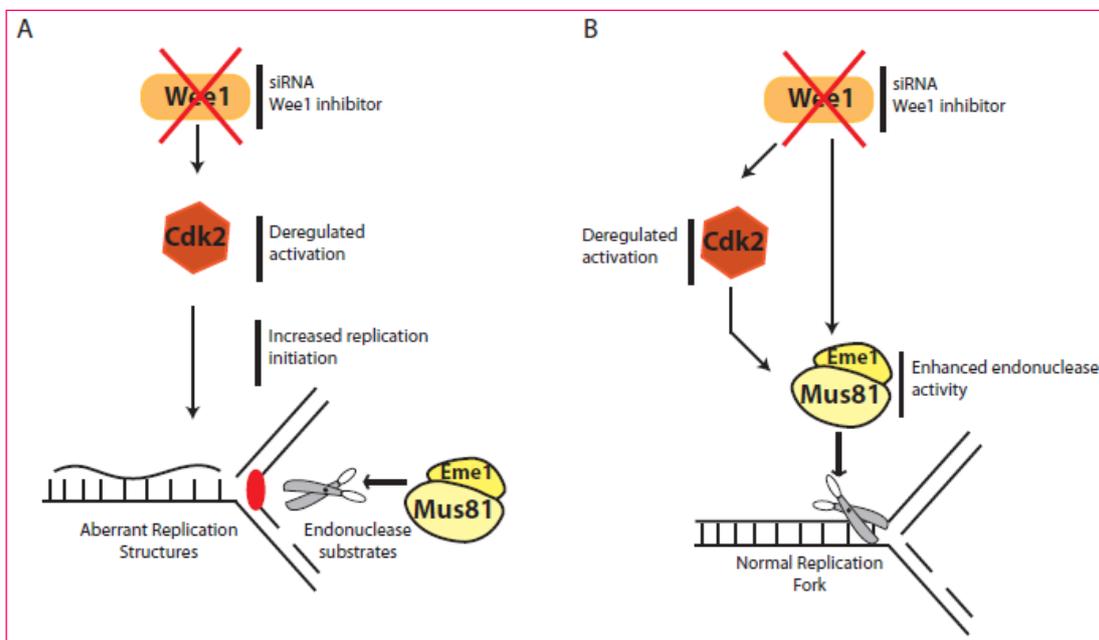


Figura 13. Relación entre Mus81 y Wee1. A) La inhibición de Wee1 activa Cdk2, que se encarga de desregular la replicación del DNA, produciendo así estructuras aberrantes que son sustratos de la endonucleasa específica Mus81/Eme1. B) Wee1 regula o bien directamente, fosforilando e inhibiendo Mus81, o bien indirectamente a través de la inhibición de Cdk2, que podría ser un activador de esta endonucleasa (Martín *et al.*, 2011).

-CAD (Caspase- activated DNase). Es la nucleasa implicada en la apoptosis mejor caracterizada y, aunque CAD está muy conservada evolutivamente desde insectos hasta mamíferos, no se ha encontrado ni en eucariotas inferiores, ni en nemátodos ni en plantas. CAD funciona exclusivamente durante la apoptosis y destaca por su papel esencial en la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA (Widlak and Garrard, 2005). CAD y su chaperona inhibitoria, ICAD, forman

un complejo inactivo en células vivas. La localización celular exacta del complejo CAD-ICAD es controvertido, puesto que estas proteínas tras un estímulo apoptótico son detectadas rápidamente en el núcleo, pero también pueden ser aisladas del citosol (Liu *et al.*, 1998).

El complejo CAD-ICAD se puede unir al DNA, pero la presencia de ICAD previene el corte del DNA, aparentemente previniendo la dimerización de CAD. Tras la inducción de la apoptosis, la caspasa-3, caspasa-7 y/o el granzima-B cortan ICAD por dos sitios, liberando así a CAD activa (Figura 14) (Samejima and Earnshaw, 2005; Masato *et al.*, 1998). Una vez activada CAD, forma homodímeros u oligómeros que quedan inmovilizados a través del extremo N-terminal dentro del núcleo apoptótico. Esta inmovilización, mediante su unión al DNA o cromatina, puede prevenir la liberación de CAD activa al espacio extracelular durante la apoptosis (Hideki *et al.*, 1999).

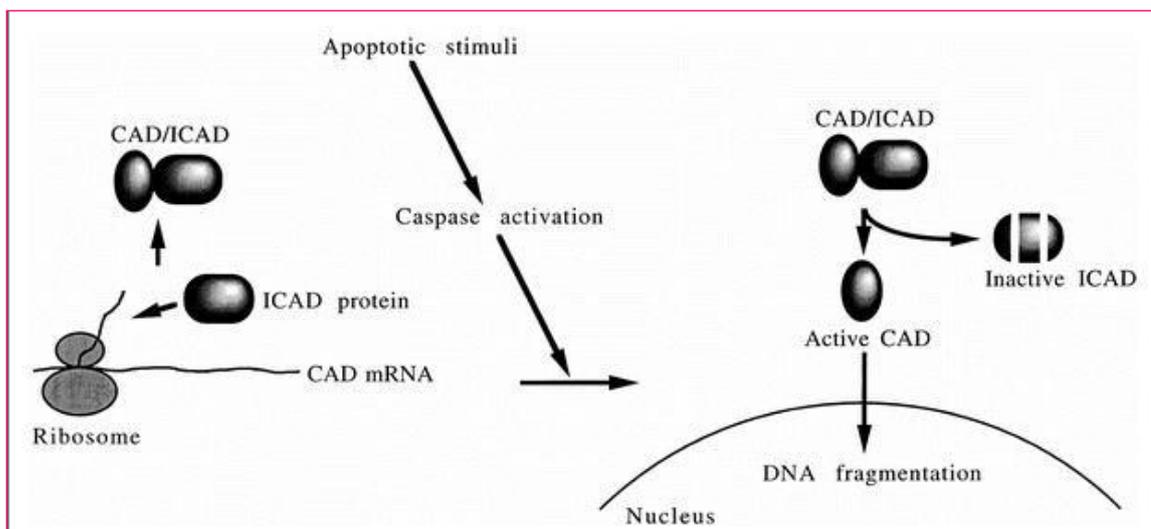


Figura 14. Activación de CAD. Cuando la proteína de CAD está siendo sintetizada, ICAD se une a la cadena nascente de CAD permitiendo así su correcto plegamiento. ICAD permanece unida a CAD, formando un complejo inactivo, que inhibe así su actividad DNase y oculta su señal de localización nuclear para mantenerla en el citosol. Cuando hay un estímulo apoptótico, las caspasas activas cortan ICAD y, una vez liberada CAD, puede entrar al núcleo donde degrada el DNA cromosómico (Masato *et al.*, 1998).

La importancia de CAD en la fragmentación del DNA durante la apoptosis se ha demostrado en muchos estudios con células deficientes en componentes del sistema CAD. En modelos *knockout* (KO) de ratón, tanto de CAD como de ICAD, se ha visto que las células apoptóticas tienen un menor número de fragmentación

internucleosomal del DNA (o directamente no tienen). Además, la cromatina se condensa únicamente en la periferia nuclear y no se forman los cuerpos apoptóticos. A pesar de estos cambios, la ejecución de la apoptosis tiene lugar de forma eficiente sin que ocurra la fragmentación del DNA (McIlroy *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998). Se ha sugerido también que CAD podría ser la nucleasa responsable de la aparición de HMWF, ya que en células deficientes de CAD-ICAD no aparece HMWF seguida a la inducción de la apoptosis (Samejima and Earnshaw, 2000; McIlroy *et al.*, 2000). Sin embargo, no está todavía claro ya que podría ser que CAD cause HMWF en algunos tipos de células y no en otros. Otros estudios con ratones KO del sistema CAD, han demostrado que CAD es la principal nucleasa en la mayoría de células apoptóticas. En estos KO, la eliminación de CAD o ICAD, casi eliminaba por completo la aparición de LMWF durante la apoptosis. Sin embargo, las células de KO para ICAD exhibían niveles bajos de fragmentos de bajo peso molecular, sugiriendo así la existencia de otras nucleasas apoptóticas (Zhang *et al.*, 1998).

-Otras nucleasas que podrían estar involucradas en la fragmentación del DNA (Figura 15) (Higuchi, 2003).

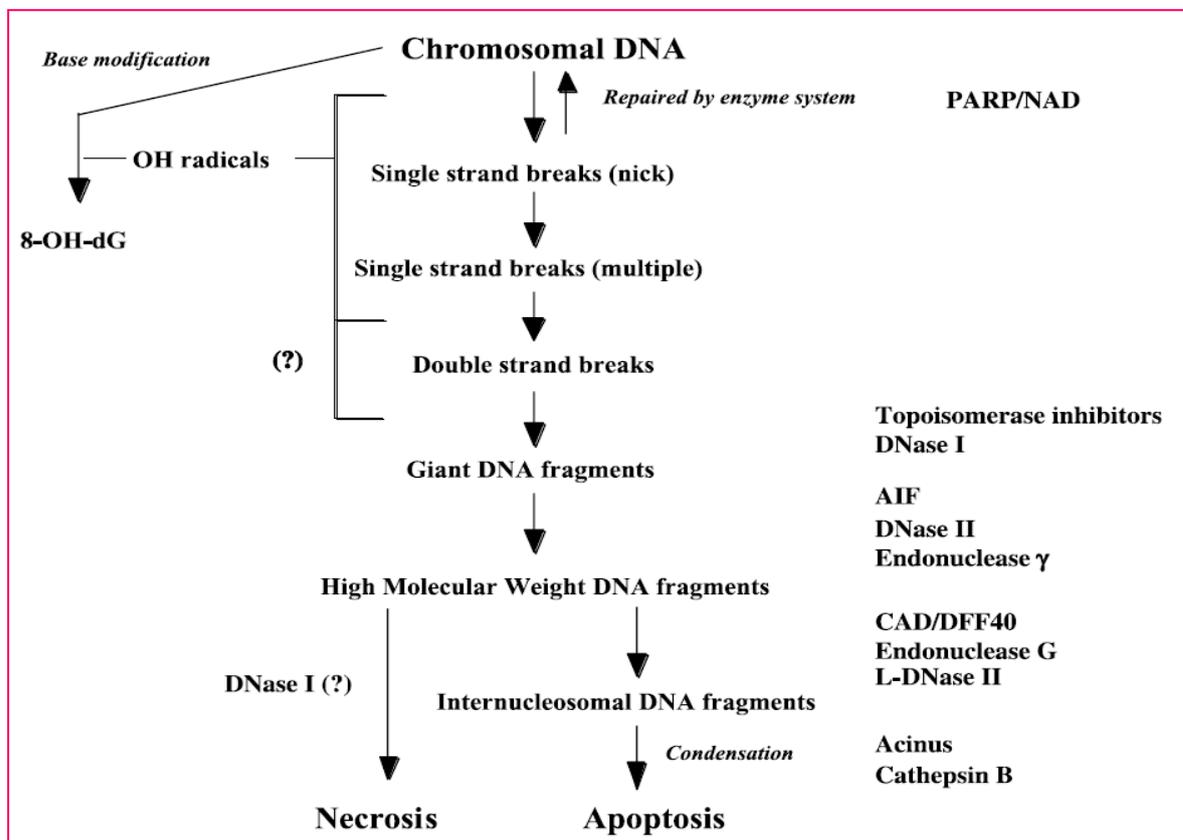


Figura 15. Posibles nucleasas involucradas en la fragmentación del DNA (Higuchi, 2003).

La DNase I es una nucleasa específica de corte de una hebra (*single strand-specific nuclease*), la cual se piensa que es específica para algunos tipos concretos de estructuras de DNA. Su función principal es la de degradar el DNA extracelular.

Por otro lado se encuentra también la Endonucleasa G (EndoG), que es un nuevo tipo de endonucleasa que se ha involucrado en apoptosis. Se trata de una nucleasa específica de mitocondria que se transloca al núcleo durante la apoptosis, donde induce LMWF. Aunque la activación de caspasas no es necesaria para su activación (Li *et al.*, 2001). Endo G prefiere ssDNA o RNA antes que dsDNA como sustratos (Samejima and Earnshaw, 2005).

AIF (*apoptosis-inducing factor*) es una flavoproteína que comparte homología con las oxidoreductasas bacterianas. Su activación, al igual que EndoG, es independiente de la activación de caspasas (Cregan *et al.*, 2002). Normalmente está confinada en las mitocondrias pero se transloca al núcleo tras la inducción de la apoptosis (Susin *et al.*, 1999). Su translocación provoca una condensación parcial de la cromatina en la periferia del núcleo. Esta proteína causa la degradación del DNA en fragmentos grandes de aproximadamente 50Kbp de longitud.

Otro factor de condensación de la cromatina localizado en el citoplasma y que se transloca al núcleo tras la inducción de la apoptosis, es la L-DNase II. Ésta causa una condensación marcada de la cromatina y la corta en fragmentos nucleosomales de igual tamaño. Es una endonucleasa que requiere un ambiente intracelular ácido para poder activarse y cortar el DNA (Torrighia *et al.*, 1998).

Por último, también existen otras proteínas que pueden contribuir a esta condensación de la cromatina y a la consecuente fragmentación del DNA internucleosomal como son la endonucleasa γ (Shiokawa *et al.*, 1997) y la catepsina B (Vancompernelle *et al.*, 1998). Ambas podrían ser activadas una vez liberadas de los lisosomas de las células apoptóticas.

5.2.3 Implicación de las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan normalmente durante el metabolismo aeróbico de las células en numerosas reacciones biológicas y están implicadas en un amplio número de situaciones patológicas. La principal fuente de

ROS es la mitocondria, donde el oxígeno es reducido a agua en la cadena de transporte de electrones, produciéndose las moléculas intermedias superóxido de oxígeno (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Así pues, el metabolismo celular depende del suministro continuo de ATP de la mitocondria, por lo tanto, un exceso de producción de ROS o cualquier daño producido en la cadena respiratoria pueden tener un efecto grave en la viabilidad celular. Entre otras cosas, las ROS pueden causar peroxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas y daño en los ácidos nucleicos, es decir, todos los componentes celulares pueden ser dañados como consecuencia de un aumento descontrolado en la producción de ROS. Es por ello que, aunque las ROS se produzcan de forma continúa durante el metabolismo normal de las células, su producción en situaciones patofisiológicas excede la capacidad de las células para defenderse contra sus efectos dañinos. Por lo tanto, es necesario que exista un balance entre la producción normal de ROS y la defensa antioxidante, conocido como el balance redox (reacción de reducción-oxidación).

Para proteger a las células de estrés oxidativo, la mitocondria contiene sistemas de defensa que detoxifican las ROS y reducen los daños producidos por éstos. Existen muchas moléculas capaces de inhibir las reacciones de oxidación debidas a ROS, ya sea previniendo su formación o bien secuestrándolos, evitando así que tenga lugar la reacción en cadena. Entre estos agentes encontramos secuestradores (llamados *scavengers*) como los agentes quelantes de metales (por ejemplo, la deferoxamina) o proteínas entre las que se encuentran la ferritina y la transferrina, entre otras. Además, existen muchos antioxidantes, que son compuestos de bajo peso molecular que o bien son sintetizados por las propias células o suplementados en una dieta normal. Entre ellos encontramos antioxidantes como el ácido úrico, ascorbato o α -tocofenol (vitamina E).

Uno de los antioxidantes más importantes que está presente en las células es el glutatión (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH). Tiene numerosas funciones biológicas como son: detoxificación de xenobióticos, regulación del estado redox de los grupos sulfhidrilo de las proteínas, así como también está implicado en la síntesis tanto de DNA como de proteínas. El GSH es sintetizado por las células por dos enzimas dependientes de ATP: γ -glutamilcisteína sintetasa (GSC) y la glutatión sintasa.

Otro de los antioxidantes que se utilizan en estudios es la N-acetilcisteína (NAC). Se trata de una forma estable del aminoácido no esencial L-cisteína. Este

compuesto actúa como estabilizador en la formación de estructuras de proteínas, y también es un componente imprescindible para la formación del glutatión.

La producción elevada de ROS se ha implicado en la despolarización de la membrana mitocondrial y en la inducción de muerte celular. Se sabe que la permeabilización de la membrana mitocondrial es un proceso esencial en la muerte celular programada (PCD) y, por tanto, decide qué células mueren y cuáles no. Se ha visto que las especies reactivas de oxígeno sirven como mediadores, tanto directos como indirectos, de la PCD en células de mamífero y en plantas. Son muchas las evidencias que involucran la producción de ROS, primero con la transmisión de la señal durante la fase de iniciación de la muerte celular y por último, con la consecuente permeabilización mitocondrial que conduce a la destrucción final de la célula (Jabs, 1999; Jacotot *et al.*, 1999). Estudios posteriores fueron determinando que, además del papel esencial que tiene la mitocondria durante la apoptosis (liberación factores pro-apoptóticos, pro-caspasas y factores independientes de caspasas, AIF), los ROS producidos durante el metabolismo de las mitocondrias, podrían tener un papel importante en la muerte celular, relacionándose así su producción con las fases iniciales y finales de la apoptosis (Fleury *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014).

En humanos, el estrés oxidativo se ha visto implicado en un amplio rango de patologías incluyendo cáncer, diabetes de tipo II, arterosclerosis, procesos inflamatorios crónicos y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Dröge, 2002). Se ha aceptado abiertamente que muchos tipos de cáncer resisten mejor el estrés oxidativo comparado con las células normales, hecho que podría ser esencial en la tumorigénesis, progresión e invasión del tumor (Behrend *et al.*, 2003). Se ha visto además que un aumento excesivo de ROS puede producir errores en el funcionamiento del metabolismo mitocondrial, afectando a la viabilidad celular (Ott *et al.*, 2007).

Se ha observado que las ROS producidas durante el metabolismo celular normal puede oxidar las bases del DNA, promoviendo así la generación tanto de SSB como DSB (Aparicio *et al.*, 2014).

5.3 Sistemas de reparación de daño al DNA

Enfocar los tratamientos quimioterapéuticos contra dianas específicas de la vía DDR, que incluye las vías de reparación del DNA, y el ciclo celular, es una estrategia que está siendo investigada por muchos oncólogos. El hecho de que muchas terapias se basen en la radiación o en fármacos, como TMZ, que causan daño al DNA hace que la modulación de la DDR sea una buena diana para conseguir que los tumores sean más sensibles a la terapia. Por otro lado, ya que las células cancerígenas pueden tolerar mejor los daños y los desajustes en el DNA debido a la desregulación de los puntos de control y de las vías de reparación, es necesario estudiar más a fondo los mecanismos de resistencia al daño al DNA para poder establecer qué diana terapéutica será más eficaz. Es por ello, que el hecho de poder establecer qué alteraciones tienen las células tumorales en vías como la DDR podrá servir de guía para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra moléculas específicas que obliguen a estas células a entrar en mitosis sin haber reparado los daños en el DNA, promoviendo así muerte por catástrofe mitótica o apoptosis. En resumen, tanto la monoterapia como las terapias combinadas que puedan modular alguna de las vías mencionadas anteriormente, representan un método atractivo para poder eliminar las células tumorales de GBM (Alexander *et al.*, 2012).

La DDR se puede dividir en diferentes tipos según la lesión producida. El sistema de excisión de bases (BER) repara lesiones oxidativas o SSB. Las bases dañadas se retiran y toda la región se sustituye por bases nuevas. Los enzimas más implicados en esta función son PARP1 y PARP2 (*polyADP-ribose polymerase 1 and 2*). Por otro lado, las lesiones causadas por la luz ultravioleta (UV) son reparadas por el sistema de excisión de nucleótidos (NER), donde las bases que envuelven la lesión son eliminadas y la maquinaria convencional de replicación del DNA se encarga de repararlas. Además, la mala incorporación de bases producida por una mala replicación del DNA así como también la formación de pequeñas deleciones e inserciones provoca errores de emparejamientos, los cuales son reparados por el sistema de reparación *missmatch* (MMR). Las células disponen también de enzimas encargados de reparar directamente el daño producido, como es el caso de la MGMT. Este enzima elimina los grupos metilo que añaden ciertos agentes alquilantes, como el TMZ (Lord and Ashworth, 2012). Por último, los DSBs, en células de mamífero, pueden ser reparados

principalmente a través de dos sistemas, controlados por diferentes grupos de proteínas: por recombinación homóloga (HR), que es un mecanismo libre de error; o por recombinación no homóloga (*non-homologous end joining*, NHEJ), la cual es propensa a inducir errores y se trata del sistema más común (Figura 16).

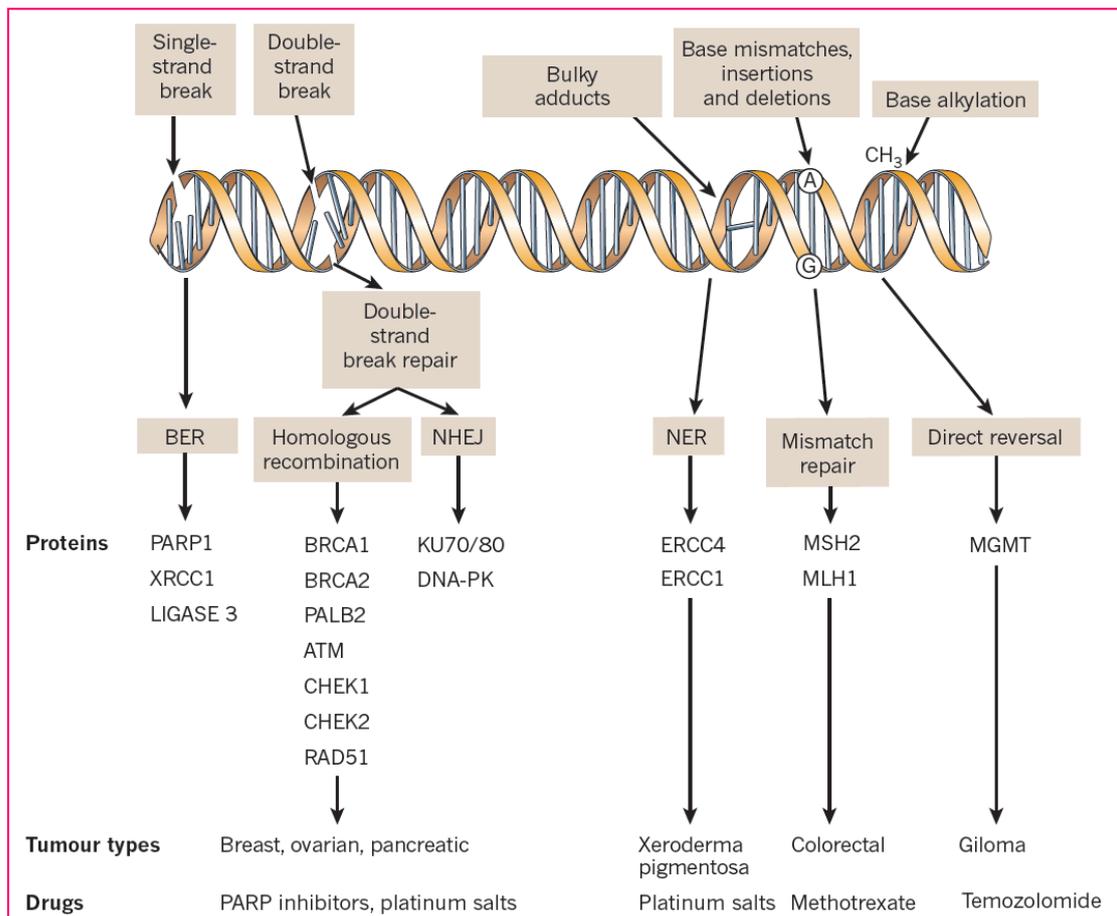


Figura 16. Resumen de los mecanismos de reparación del DNA que mantienen la estabilidad del genoma. El DNA está continuamente expuesto a procesos y/o sustancias que provocan lesiones, tanto SSB como DSB. La elección del mecanismo de reparación está bastante definida por el tipo de daño, pero factores como en qué fase del ciclo celular se encuentra la célula en el momento del daño tienen también un papel importante. En esta figura se muestra la relación entre el tumor, la vía afectada y el fármaco dirigido (Lord and Ashworth, 2012).

5.3.1 Recombinación homóloga, HR

Se trata de un mecanismo que asegura la reparación correcta y exacta de los DSB que se han formado en el DNA. En este sistema la polimerasa de DNA utiliza como molde una hebra de DNA homóloga adquirida de una cromátida hermana intacta, para poder sintetizar el DNA nuevo en lugar de la secuencia dañada (McKinnon and Caldecott, 2007). Es por ello, que se trata de una ruta que actúa únicamente en estadios finales de la fase S y G2 del ciclo celular.

En esta vía están involucrados diversos tipos de proteínas, entre los que se encuentran el grupo de proteínas RAD (*DNA repair protein*) que incluyen RAD50, RAD51, RAD52 y RAD54; y proteínas BRCA (*Breast cancer proteins*) que se encargan del intercambio de bases; el complejo de proteínas MRN para la resección; la polimerasa para la síntesis de DNA; la endonucleasa MUS81-EME1 involucrada en la resolución de la HR y proteínas como RPA1 (*replication protein A1*), XRCC1, XRCC3 (*DNA repair proteins types 1 and 3*), que aseguran una gran fidelidad en la reparación de los daños (Polo and Jackson, 2011).

5.3.2 Recombinación no homóloga, NHEJ

Este sistema no necesita ninguna secuencia homóloga para reparar los daños, sino que se trata de un mecanismo en el cual se unen directamente los dos extremos libres del DSB y, por lo tanto, no necesita la resección de la zona. El inconveniente de este proceso es que es más propenso a producir errores. Sin embargo, se trata del sistema más utilizado por la célula debido a su rapidez a la hora de realizar la reparación.

Los extremos del DSB son reconocidos por el heterodímero formado por KU80/KU70, seguido del reclutamiento de la DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*). Otros factores que permiten el procesamiento de las estructuras de DNA que impiden la reparación, por ejemplo el 3'-fosfoglicolato, son también recluidos al sitio de rotura; incluyendo principalmente proteínas como Artemis, PALF (*PNK and APTX-like FHA protein*) y PNKP (*polynucleotide kinase/phosphatase*). Los últimos pasos de reparación de la vía NHEJ incluyen la

unión de los dos extremos del DNA por la DNA ligasa IV, que es asistida por sus cofactores, como son XRCC4 y Cernunnos/XLF (Grabarz *et al.*, 2012).

El sistema que determina cuál de los dos mecanismos de reparación de los DSB actúa dependerá de dos factores importantes: 1) de la fase del ciclo celular donde se han producido las lesiones (en G1 sólo hay una copia de DNA, y por el contrario, en S/G2 hay dos copias), y en consecuencia, 2) del proceso de resección en el DSB, ya que éste es necesario para el sistema HR, pero no para el sistema NHEJ. La resección tiene lugar en sentido 5' → 3' en el punto donde ha tenido lugar la rotura por parte del complejo MRN y otros factores.

Recientemente, ha surgido la idea de la existencia de un nuevo proceso de reparación de los DSB distinto a las vías HR y NHEJ, tanto mecánica como genéticamente. Este mecanismo es conocido como unión de los extremos alternativo (*alternative end-joining, A-EJ*) y se trata de un sistema que todavía no se ha caracterizado del todo. Se ha visto que A-EJ es un proceso bastante mutagénico, en el que se usan frecuentemente micro-homologías (2 a 8 nucleótidos), que se encuentran alejadas de la rotura, mientras que en el NHEJ las micro-homologías pueden ser usadas en el sitio de daño. En este modelo, se ha propuesto que A-EJ se inicia por la resección de ssDNA (*single-stranded DNA*), revelándose que las micro-homologías complementarias pueden anillarse para formar una estructura ramificada complementaria que resulta en deleciones en las uniones de reparación (Grabarz *et al.*, 2012). Proteínas como PARP-1, XRCC1, DNA ligasa III, PNK y WRN (*DNA helicase*) se han visto implicadas en este proceso (Robert *et al.*, 2009).

Como conclusión, es importante remarcar que un sistema de reparación que sea eficiente y fiel, es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica y supervivencia de las células. Por lo tanto, la elección de la ruta adecuada es un paso crucial. Las rutas de señalización celular, las modificaciones de la cromatina y los estadios iniciales del procesamiento de las roturas, juegan un papel primordial en dirigir la reparación hacia HR o NHEJ. Por ello, controlar los pasos iniciales de la reparación de los DSB, particularmente el inicio de la resección es un paso crucial que puede ser irreversible si se toma la decisión equivocada, y puede tener finalmente consecuencias dramáticas.

6. Proteínas desreguladas en cáncer

Como ya sabemos, el cáncer es una enfermedad que se produce en células normales que comienzan a proliferar de forma autónoma y más rápidamente, invadiendo localmente y, en algunos casos, a distancia otros tejidos. Esta proliferación incontrolable provoca alteraciones, tanto aumentando como disminuyendo, de muchos tipos de proteínas lo que hace que las células adquieran funciones que no les corresponden. Este tipo de células cancerígenas acaban adquiriendo resistencia a la muerte y a muchos tratamientos farmacológicos.

A continuación, explicaremos brevemente varias proteínas que se encuentran desreguladas en GBM y que han sido motivo de estudio a lo largo de este proyecto.

6.1 **Proteínas importantes en el punto de control G2/M**

La manipulación de la actividad quinasa se ha convertido en un concepto terapéutico importante en el cáncer humano, ya que las quinasas regulan funciones celulares cruciales como proliferación, apoptosis, metabolismo celular, migración, reparación del DNA dañado y respuestas al microambiente. En los últimos años, se ha visto que muchos cánceres humanos están dirigidos por estas quinasas, por ello, se está evaluando la producción de moléculas que inhiban las funciones de éstas como agentes terapéuticos contra el cáncer (Sørensen and Syljuåsen, 2012) (Figura 17).

Chk1, también conocida como CHEK1, es la principal efectora del punto de control G2 cuando existe daño al DNA. Se trata de una proteína quinasa que fosforila a cdc25, una fosfatasa que regula el ciclo celular, especialmente la entrada en mitosis. Cuando esta fosfatasa está fosforilada, por la acción de Chk1, la célula queda parada y no puede entrar en mitosis. La activación de Chk1 requiere la fosforilación de los residuos del dominio C-terminal, proceso catalizado por la proteína quinasa ATR (Tapia-Alveal *et al.*, 2009). Debido a que el punto de restricción G2 parece tener un papel importante en la supervivencia de las células tumorales, existe un gran interés en inhibir este tipo de quinasas como tratamiento anti-cancerígeno.

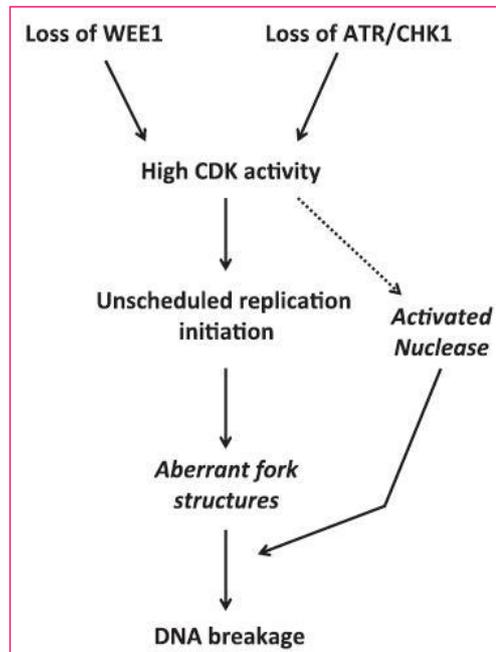


Figura 17. Modelo de cómo la pérdida de las quinasas del punto de control pueden causar rotura del DNA. La inhibición de proteínas como Wee1, ATR o Chk1 produce un aumento en la actividad cdc, causando el inicio de la replicación. Debido a este inicio no programado en la replicación del DNA, se acumulan estructuras de horquilla aberrantes que son propensas a romperse y acaban produciéndose roturas dobles en las hebras del DNA (*double strand break*, DSB) (Sørensen and Syljuåsen, 2012).

Analizando los perfiles de expresión de las proteínas quinasas en varios tipos de tumores, se ha visto que la quinasa Wee1 se encuentra sobre-expresada en glioblastoma multiforme. Wee1 es una proteína quinasa involucrada en el control del punto de restricción G2, actuando directamente sobre cdk1 (también conocida como *cell division control protein 2 homolog*, CDC2), la proteína más importante en la progresión del ciclo en G2. Wee1 cataliza la fosforilación inhibitoria de la tirosina (Y15) en la quinasa cdk1/ciclinaB previniendo la transición G2/M.

Parte de la resistencia de las células de GBM a irradiación o quimioterapia es debida a la habilidad que tienen de reparar los daños en el DNA durante la parada del ciclo celular en G2. Se ha visto que la inhibición de Wee1 provoca la salida de esta parada del ciclo celular, haciendo que las células entren en mitosis, induciendo así una catástrofe mitótica y finalmente, muerte celular. Esta estrategia resulta en una gran citotoxicidad *in vitro* y más importante aún, en la erradicación de los tumores cerebrales irradiados en ratones, sin mostrar ningún efecto secundario adverso. Por este motivo, la combinación de agentes que permitan la liberación de la parada en G2/M con agentes que causen daño al DNA, es una buena estrategia terapéutica anti-tumoral. Dado que la

principal reguladora de este punto de control es la quinasa Wee1, muchos esfuerzos se están centrando sobre esta proteína para profundizar más en el papel que podría tener su intervención quimioterapéutica y cómo podría desencadenar la muerte celular. Como consecuencia, la manipulación de la actividad o expresión de Wee1 es una herramienta llamativa para sensibilizar las células de GBM y conseguir mejoras en la terapia (Mir *et al.*, 2010).

Finalmente, los datos pre-clínicos indican que la inhibición de Wee1 promueve la catástrofe mitótica debida a la prematura entrada en mitosis con daños letales en el DNA que no han sido previamente reparados. Esta estrategia se dirige selectivamente a células que dependen de la parada del ciclo en G2, en la que las células tumorales con deficiencias en la señalización de p53 contrastan con las células normales. Por ello, la combinación de técnicas que dañan al DNA con la consiguiente inhibición de Wee1, es un método atractivo y esperanzador para dirigirse contra las células de glioblastoma multiforme (De Witt Hamer *et al.*, 2011).

6.2 Survivina

Survivina es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (*IAP, inhibitor apoptosis protein*) que se localiza en múltiples compartimentos intracelulares, incluyendo núcleo, mitocondria y, centrosomas y microtúbulos mitóticos (Jiang *et al.*, 2010). Esta proteína se ha implicado en apoptosis, en la respuesta a estrés celular y en los mecanismos del punto de control que mantienen la integridad genómica. Además de su función como protectora de la célula, survivina regula la dinámica de los microtúbulos y su función es esencial durante la mitosis. Se ha visto que alteraciones en la expresión de survivina causa parada de proliferación celular, bloqueo de la mitosis en pro-metafase, defectos en los cromosomas (mal alineamiento de las cromátidas) y fallos en la citocinesis; indicando que se trata de una proteína mitótica esencial para una correcta división celular (Altieri, 2006). Durante la mitosis, esta proteína se asocia físicamente con las proteínas INCENP (*inner centromere protein*), Aurora B y Borealin/Dasra B, formando así un complejo que se dirige a las cinetocoros y se encarga de corregir los cromosomas mal alineados, formar correctamente el huso mitótico central y completar la citocinesis (Honda *et al.*, 2003; Gassmann *et al.*, 2004). Para determinar la importancia de su función durante la división celular, se realizaron

análisis de la dinámica de los microtúbulos usándose siRNA dirigidos contra survivina. Los resultados indicaron que se aumentaba el número de microtúbulos nucleados en los centrosomas, lo que producía un aumento en la inestabilidad de los microtúbulos, viéndose aumentada la incidencia de catástrofe mitótica (Rosa *et al.*, 2006). Por otra parte, se sabe que survivina se expresa en varios tejidos fetales regulados por apoptosis, pero en muy pocos tejidos adultos diferenciados. Además, se ha observado que survivina está sobre-expresada en varios cánceres humanos muy comunes, por ejemplo, en cáncer de tipo gástrico, colorectal, de vejiga y en neuroblastoma entre otros; asociando su expresión con un mayor avance y agresividad de la enfermedad (Azuhata *et al.*, 2001).

6.3 TPX2

TPX2 es una proteína que se asocia con los microtúbulos, activando así a la quinasa reguladora del ciclo celular, Aurora A, y encargándose además de regular la formación del huso mitótico. La expresión de esta proteína es esencial para la función del huso acromático y la correcta segregación de los cromosomas. TPX2 es una proteína cuya expresión se encuentra muy regulada a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular, siendo detectable desde la transición G1/S hasta la citocinesis, donde desaparece por completo. Su localización va variando según la etapa del ciclo celular, ya que durante las fases S y G2 se localiza en el núcleo y sin embargo, durante la mitosis se sitúa en los polos del huso mitótico (Pérez de Castro and Malumbres, 2012). Se ha observado que TPX2 está sobre-expresado en varios tumores humanos, relacionándose con la presencia de inestabilidad cromosómica. Además, esta sobreexpresión se correlaciona con el grado y estado del tumor, siendo un marcador de peor pronóstico tumoral en diferentes tipos de tumores humanos que incluyen, entre otros, cáncer de cerebro, pecho, colorectal, pulmón y ovarios (Asteriti *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2013). Por otro lado, se han realizado estudios en los cuales se inhibía la expresión de esta proteína, ya sea mediante inhibición farmacológica o mediante siRNA, resultando en una deficiente nucleación de los microtúbulos y en la aparición de anormalidades en la formación del huso mitótico que previenen la segregación de los cromosomas y dificulta el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (Aguirre-Portolés *et al.*, 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El glioblastoma multiforme es uno de los tumores humanos más agresivos y de peor pronóstico. Los tratamientos anti-tumorales actuales son totalmente ineficaces, por lo que es necesario el diseño y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan alargar la esperanza de vida y en la medida de lo posible, curar a los pacientes afectados por esta enfermedad.

Actualmente se están probando nuevos fármacos en la lucha contra este tipo de cáncer. Un tipo de fármacos que ha sido incluido en ensayos clínicos es el grupo los inhibidores de las HDAC por sus claros efectos anti-tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* sobre distintos tipos de neoplasias. Dos de los HDACi que se han incluido en ensayos clínicos para el tratamiento del GBM son VPA y SAHA, los fármacos que se han elegido para la realización de este estudio.

La hipótesis de este trabajo es que los cambios moleculares inducidos por los inhibidores de las HDAC en las células tumorales de GBM son clave para incrementar la susceptibilidad a la muerte celular en este tipo de tumores.

Por lo tanto el objetivo principal de este trabajo ha sido:

- ✚ Analizar los cambios moleculares causados por los HDACi que conducen a la muerte celular en las células tumorales de glioma

Para llevar a cabo este objetivo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la capacidad de los HDACi de inducir la muerte de las células de glioma.
2. Definir el tipo de muerte celular que promueven los HDACi y los mecanismos implicados.
3. Determinar en qué medida los HDACi son capaces de sensibilizar a las células de glioma a la muerte por TRAIL.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos Celulares

1.1 **Líneas Celulares de glioma**

A lo largo de este proyecto, se ha trabajado con tres líneas celulares de glioma U87-MG, U251-MG y LN229. La línea U87-MG proviene de un glioblastoma de grado IV originado en una mujer caucásica de 44 años de edad (Ponten & Macintye 1968). La línea U251-MG proviene de un glioblastoma multiforme originado en un hombre caucásico de 75 años de edad (Ponten & Macintye 1968). Por último, la línea celular LN229 se estableció en 1979 a partir de células extraídas de un glioblastoma del córtex derecho frontal parieto-occipital de una mujer caucásica de 60 años de edad. Todas ellas han sido adquiridas de Bancos Internacionales de Tejidos: las líneas U87-MG y U251-MG de “*Cell Lines Services*” (CLS, Eppelheim Germany) y la línea LN229 del “*American Type Cell Collection*” (ATCC, Manassas, VA, USA). Todas ellas fueron testadas periódicamente a lo largo del estudio y no presentaban contaminación por micoplasma.

La línea U87-MG es muy común en estudios *in vitro* para investigar el efecto citotóxico de fármacos quimioterapéuticos sobre este tipo de tumor. Es una línea muy fácil de identificar, ya que su característica principal es la formación de esferas, aunque parte de la población celular se adhiere directamente a la superficie de la placa. Se ha observado la presencia de una mutación homocigótica en PTEN, además de mutaciones en genes que se encuentran relacionados con adhesión celular.

La línea U251-MG es la línea más idónea para el estudio del glioblastoma, ya que presenta un fenotipo y comportamiento muy similar tanto *in vitro* como *in vivo* (xenotransplantado en ratón) del crecimiento de los tumores humanos. Se trata de células que crecen muy adheridas a la placa y se ha visto que presenta mutaciones tanto en PTEN como en p53.

En referencia a la línea LN229, presenta mutaciones en p53, así como en otros genes supresores de tumores, pero no presenta ninguna alteración en PTEN. Esta es la

línea que crece más rápidamente y al igual que ocurre con la línea U251-MG, se trata de una línea que crece fuertemente adherida al plástico de las placas de cultivo.

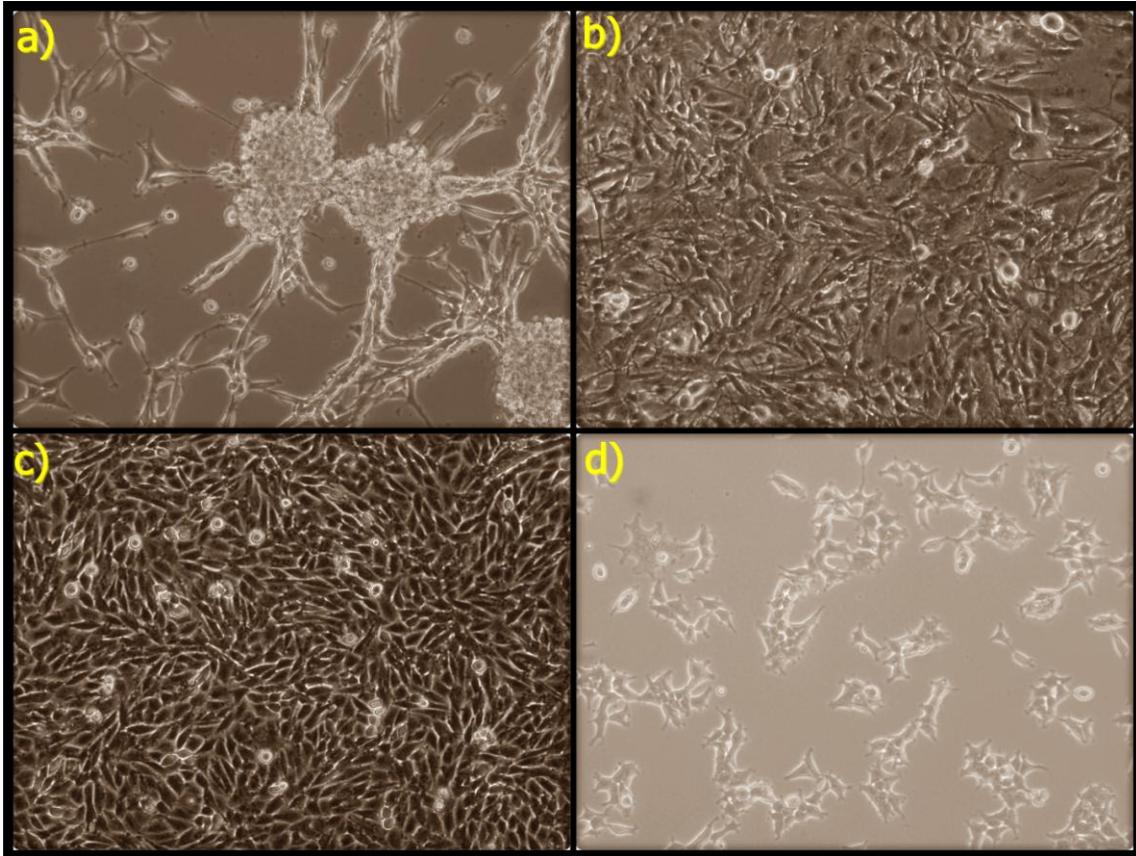


Figura 18. Imágenes de las diferentes líneas con microscopio de contraste de fase. A) Células de la línea de glioma U87-MG donde se aprecia su tendencia a crecer formando esferas. **B)** Placa confluyente de células de la línea U251-MG. **C)** Cultivo de células de la línea LN229 fuertemente adheridas al plástico. **D)** Células HEK293T a baja confluencia. Estas células se utilizan como células empaquetadoras en la producción de lentivirus.

1.2 Mantenimiento Líneas Celulares de Glioma

Tras la puesta en cultivo a partir de alícuotas congeladas, las tres líneas han sido testadas periódicamente para asegurar la ausencia de contaminación por micoplasma. Las células se han mantenido en crecimiento en un incubador de CO₂ (Thermo Scientific) con elevada humedad atmosférica a 37°C y 5% CO₂, mediante la realización de pases de mantenimiento de forma regular, dos veces a la semana. Los medios de cultivo utilizados son *Minimum Essential Medium* (MEM, Gibco 21090) suplementado

con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2mM L-Gln, 1% aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco 11140), 1mM piruvato (Gibco 11360), 10U/ml penicilina y 5µg/ml de estreptomicina para las líneas U87-MG y U251-MG, y *Dulbelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco 41965) suplementado con 10% FBS, 1mM piruvato, 10U/ml penicilina y 5µg/ml de estreptomicina para la línea LN229. El procedimiento a partir de una placa de petri de 10mm de diámetro (p100) confluyente es el siguiente:

- Aspirar el medio de cultivo mediante una bomba de vacío (eliminamos células muertas que quedan en suspensión) y lavar la monocopa con solución salina con tampón fosfato (PBS).
- Desenganchar las células de la superficie de la placa con Tripsina-EDTA (Gibco 25200) e incubar 3-4min a 37°C.
- Recoger las células, ya en suspensión, con medio de cultivo, el cual inactivará la tripsina, y centrifugar a 200g 3min a temperatura ambiente.
- Una vez sedimentadas, eliminar el sobrenadante (medio de cultivo con tripsina), dispersar el pellet de células con pequeños golpes en el tubo y añadir medio de cultivo, dependiendo del tipo celular y del cultivo. Sembramos en placas p100 o botellas de Roux de 75cm² de área (T75).

Por lo general, en las líneas U87-MG y U251-MG la dilución de un pase de mantenimiento es de 1/3 ó 1/4; y en la línea LN229 1/5 ó 1/6; dejándolas crecer durante 3 ó 4 días respectivamente.

1.3 Cultivo y mantenimiento de células HEK 293T

También se ha trabajado con otra línea celular como línea empaquetadora en la producción de lentivirus, las células HEK293T (*human embryonic kidney transformed cells*), obtenidas del laboratorio del Dr. Eduardo Soriano (IRB Barcelona).

Esta línea se ha utilizado mucho durante las últimas décadas para la investigación de biología celular, viéndose aumentado su interés en los últimos años, en la industria biotecnológica, debido a su capacidad para producir proteínas terapéuticas y partículas víricas para terapia génica. Se trata de células embrionarias de riñón, que crecen adheridas al plástico de cultivo, cuya manipulación es muy fácil por su alta capacidad de proliferación y su fácil capacidad de transfección.

Para su crecimiento, se utiliza medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% aminoácidos no esenciales (NEAA), 1mM piruvato sódico, 10U/mL de penicilina y 5µg/mL de estreptomicina. El mantenimiento de esta línea se realiza dos veces a la semana, llevando a cabo los siguientes pasos: se añade tripsina, dejando una incubación de 1-2 minutos a 37°C, hasta que las células están desenganchadas. Después, se recogen estas células con medio DMEM-10%, transfiriéndose a un tubo estéril. Se centrifuga a 200g durante 5min, se elimina el medio y se suspende el pellet de células en medio completo. Las células se siembran en nuevas placas de petri a una dilución 1/10.

1.4 Cultivo y Mantenimiento de Células en Cultivo Primario de Glioblastoma Humanos

Esta parte se realizó en colaboración con el grupo de la Dra Judit Herreros, quién proporcionó las células en cultivo primario aisladas de cuatro tumores humanos de GBM obtenidos de pacientes del Hospital Universitario Arnau de Vilanova.

Se trabajó con cuatro cultivos primarios identificados como: C55, C65, C48 y C68. El cultivo C55 proviene de un glioblastoma de grado IV del lóbulo occipital del cerebro de un hombre de 44 años; el cultivo C65 se estableció a partir de células extraídas de un GBM de grado IV del lóbulo temporal de un hombre de 68 años; el cultivo C48 proviene de células extraídas de un GBM de grado IV del lóbulo frontal derecho de un hombre de 48 años, y por último, las células C68 provienen de un GBM de grado IV de una mujer de 63 años.

Los cultivos primarios se mantuvieron en un incubador de CO₂ (Thermo Scientific) con elevada humedad atmosférica a 37°C y 5% CO₂ para obtener células para posteriores experimentos, realizando pases de mantenimiento de forma regular, una o dos veces a la semana, dependiendo del crecimiento del cultivo. El medio de cultivo utilizado es *Dulbelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco 41965) con 10% de suero fetal bovino (FBS), 20U/ml penicilina y 20µg/ml de estreptomicina. El procedimiento a partir de una placa de petri de 10mm de diámetro (p100) confluyente es el mismo que el realizado en el mantenimiento de las líneas celulares de glioma (apartado 1.2). La dilución de los cultivos primarios es de 1/2 y para extraer proteína para analizar por western blot, las células se siembran en placas de petri de 60mm (p60) a una densidad de 8x10⁵ células por placa.

1.5 Tratamientos farmacológicos de las células de glioma

El principal objetivo es caracterizar la respuesta de las células tumorales de glioma al tratamiento con los HDACi y TRAIL y determinar qué cambios moleculares conducen a las células a la muerte.

En este trabajo, caracterizamos la respuesta de estas líneas celulares tumorales tras ser tratadas con diferentes fármacos químicos o un ligando de muerte. Básicamente se ha trabajado con los siguientes compuestos: **a)** dos inhibidores farmacológicos de las HDACs: SAHA y VPA; **b)** el inhibidor de caspasas, Q-VD-Oph, para estudiar la implicación de las caspasas en la muerte de las células, **c)** el ligando inductor de apoptosis, TRAIL y, por último, **d)** un agente alquilante llamado Temozolomida (TMZ), utilizado en quimioterapia en pacientes de GBM recurrente.

- **SAHA** (suberoylanilide hydroxamic acid) (#M9647-78-9, Cayman Chemical) (Figura 19), también conocido como Vorinostat o Zolinza™, es un inhibidor de las histona desacetilasas, que se une directamente al sitio catalítico de la enzima y, por tanto, bloquea el acceso del sustrato. Inhibe las HDACs de clase I y II y es capaz de detener el crecimiento celular en un rango amplio de células en cultivo a una concentración de 2.5-5.0µM. Es un fármaco muy utilizado en ensayos clínicos en fase avanzada para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Fue aprobado por la FDA para el uso de linfoma de células T cutáneo y, por lo tanto, está siendo utilizado en clínica.

La solución de stock de SAHA se prepara a una concentración de 75.67mM en DMSO, por lo que, para los diferentes experimentos es necesario hacer una dilución con medio DMEM-10% FBS (la dilución depende de la concentración final con la que se trabaja: 1 µM, 5µM, 10µM).



Figura 19. Estructura química de SAHA.

- **VPA** (ácido valproico) (Sigma P4543-106) (Figura 20), es un análogo natural del ácido graso valérico. Se trata de un inhibidor de las HDACs de clase I. Es inestable cuando está en solución, por ello, cada vez que se usa se ha de preparar con medio nuevo; de forma que diluimos el VPA en medio DMEM-10% FBS,

filtramos con un filtro de 0.22 μm de poro; para asegurarnos que la solución es estéril.

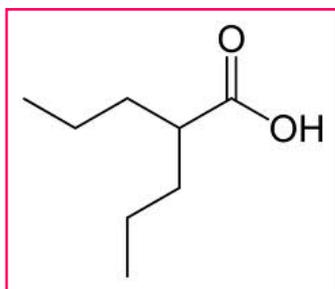


Figura 20. Estructura química del ácido valproico.

La solución de stock de VPA se prepara fresca a una concentración de 10mg/mL (60mM) en medio de cultivo y tan sólo es necesario preparar una dilución adecuada dependiendo de la concentración final deseada (5mM, 10mM, 15mM).

- **Temozolomida** (Temodar, TMZ) (Sigma T2577) (Figura 21), es un agente alquilante/metilante que se está utilizando como fármaco en quimioterapia para el tratamiento de los tumores cerebrales de astrocitoma anaplásico y GBM, además de ser usado en la recurrencia de tumores de alta gravedad. Su actividad antitumoral se basa en interferir en la replicación del DNA. Induce una parada del ciclo en fase G₂/M y muerte por apoptosis a través de la adición de un grupo metilo a la posición O⁶ de la Guanina del DNA. También induce la inactivación de una enzima de reparación de daño por escisión de bases (BER) O-(6)-alquilguanina DNA alquiltransferasa (AGT).

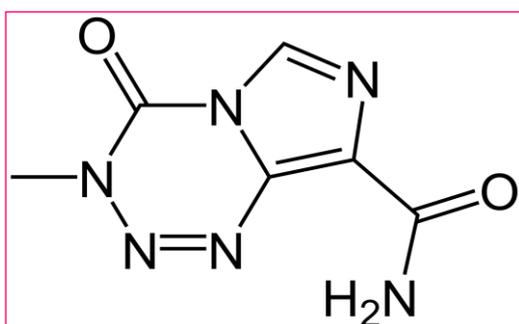


Figura 21. Estructura química del TMZ.

La solución concentrada de TMZ se prepara en DMSO a una concentración stock de 50mM. Para su uso, se diluye en medio completo fresco a la concentración de trabajo deseada, que es normalmente de 100 μM .

- **Q-VD-OPh** (#551476, Calbiochem, Merck, Alemania) (Figura 22A) es un inhibidor irreversible de caspasas con efectivas propiedades frente a la mayoría de rutas apoptóticas mediadas por caspasas; incluyendo caspasa -3/-9, caspasa -8/-10 y caspasa-12. La solución de stock se prepara a una concentración de 10mM con DMSO y suele ser usado a una concentración final de 5 μM .

- **TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL** (#207HTRAIL01, BioTrend) (Figura 22B) es una proteína del grupo de citoquinas que actúa como ligando inductor de la vía extrínseca de la apoptosis. En su forma activa es un trímero que ejerce sus efectos uniéndose a los receptores de muerte, DR4 y DR5. El proceso apoptótico es dependiente de caspasa-8.

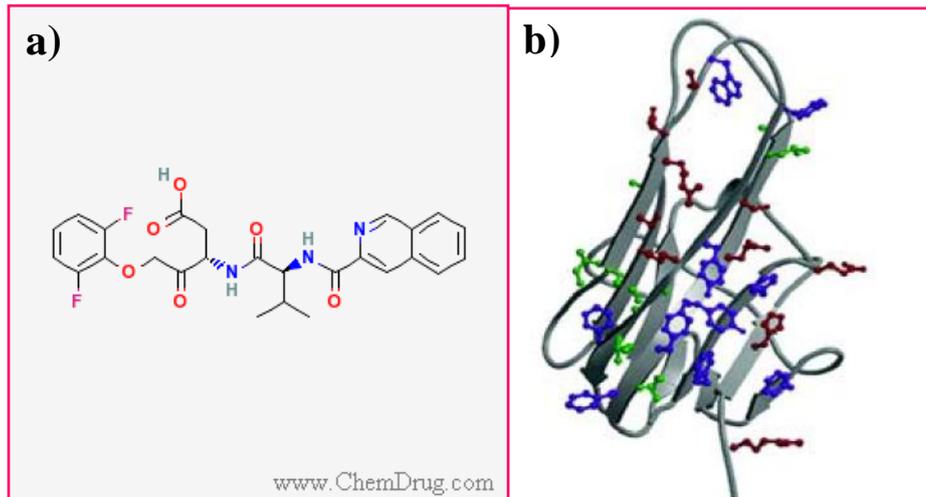


Figura22. A) Estructura Química del inhibidor de caspasas Q-VD-Oph. B) Estructura del monómero de TRAIL ilustrando los residuos que participan en la trimerización: en lila, los anillos aromáticos; en verde, los residuos hidrofóbico, y en rojo, los residuos polares (Kimberley and Screaton, 2004).

1.6 Obtención de partículas lentivirales en HEK293

Para la introducción de material genético externo en las células de glioma utilizamos vectores víricos, lentivirus. Estos se han obtenido utilizando el método de transfección del DNA plasmídico con polietilenimina (PEI) en las células empaquetadoras HEK293. El DNA cargado negativamente se unirá al polímero catiónico sintético y el complejo será entonces endocitado por las células. El protocolo de transfección es el siguiente:

- **Día 1.** El día antes de la transfección, se hace un recubrimiento de placas con gelatina y se siembran las HEK293 para la transfección. Se añade 0.1% gelatina

a las p100 y tras 20min, se aspira y se dejan secar. Se siembran 2.5×10^6 células por placa.

- **Día 2.** Se cambia el medio por 8mL medio sin antibióticos ni suero fetal bovino. Se necesitan 40µg DNA para la transfección (Tabla 3), 200µL PEI y 800µL NaCl 150mM (Sigma Aldrich) para cada placa.

Vector Lentiviral (RNAi o sobre-expresión)	20µg
Sistema de empaquetamiento (psPAX2)	13µg
Plásmido de la envoltura (pM2G)	7µg

Tabla 3. Plásmidos usados para la transfección.

Primero se diluyen los 40µg de DNA en NaCl 150mM estéril (volumen final 1mL) y se mezcla. Después, se diluyen 200µL PEI en 800µL NaCl 150mM estéril y se mezcla. Seguido, se añade la dilución de PEI en el tubo con el DNA (no al contrario), se vortea 1min y se deja reposar la mezcla 10min a temperatura ambiente. Por último, se añade la mezcla a cada placa, gota a gota y se deja en el incubador. Pasadas 3h, se cambia el medio de transfección por medio completo de HEK293T.

- **Día 5.** Se recoge el sobrenadante de cada placa a las 72h en tubos estériles de 50mL y se centrifuga a 2,500rpm, 5min. Después se filtra el sobrenadante con filtros de 0.45 µm y se centrifuga a 50,000g durante 3h a 4°C. Finalmente, se suspende el pellet en 1% albúmina de suero bovino (BSA) diluido en PBS 1X (30µL de 1% BSA/PBS por cada p100). Se guardan los virus alicuotados a -80°C. Los virus se titulan con células HEK293, añadiendo volúmenes crecientes del virus y se establece la proporción del virus/células que da mayor eficiencia de transfección, con menor toxicidad, mediante la observación de las células que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en el microscopio de fluorescencia.

1.7 Transducción de las células de glioma

Para experimentos de shRNA y sobre-expresión, usamos transducción lentiviral de las células. Para ello, sembramos las células en placas de cultivo p35 ó p60, dependiendo del experimento, a una densidad de 350.000/700.000 células, respectivamente, dejando 24h a 37°C para que las células se adhieran correctamente a la placa de cultivo. Al día siguiente, añadimos entre 10-40µL de virus concentrado directamente al medio de cultivo (para mayor detalle de la producción de lentivirus véase apartado 1.6). El medio se renueva al día siguiente y se dejan las placas a 37°C, dependiendo del experimento, sobre-expresión o shRNA, un tiempo de 48h ó 72h, respectivamente. La eficiencia en la transducción se monitoriza en el microscopio de fluorescencia, para las construcciones que contenían la secuencia codificante para la GFP. El porcentaje de células positivas para GFP debe de ser superior al 80% para poder proseguir con el experimento.

2. Biología Molecular

2.1 Materiales

- **Enzimas.** Enzimas adquiridas de TaKaRa: BamHI, SfiI y T4 DNA ligasa. Enzimas de Roche: HindIII y fosfatasa alcalina. La TaqMan® Transcriptasa Reversa se adquirió de Applied Biosystems y la PfuUltra™ High Fidelity DNA Polymerasa de Stratagene.
- **Plásmidos.** El vector pEGFP-hCaspasa-8 fue donado por el Dr Bayascas .Los vectores lentivirales pCRII y pEIGW fueron cedidos amablemente por el Dr Trono. El vector lentiviral de sobre-expresión pEIGW tiene una región de clonaje con pocos sitios de restricción. Por este motivo, es necesario clonar primero el gen de interés (hCaspasa-8) en el vector pCRII, y luego usar los sitios de restricción para SfiI presentes en ambos plásmidos.
- **Bacterias.** Usamos dos cepas diferentes de *E.coli*: las DH5α para las construcciones de plásmidos y las Stbl2™ (Invitrogen) para las construcciones

lentivirales. Las bacterias competentes se transformaron usando el protocolo de choque térmico siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las alícuotas congeladas de bacterias transformadas se guardaron a -80°C en medio Luria Broth (LB) con un 20% de glicerol.

2.2 Técnica General de Clonaje

El DNA plasmídico fue extraído usando las instrucciones del Plasmid Maxi kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración de DNA se determinó en el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Tanto el inserto como el plásmido fueron digeridos con los enzimas correspondientes. Una vez comprobada la digestión, se defosforiló el vector con la fosfatasa alcalina para evitar la re-unión de los extremos del vector vacío. Ambos, inserto y vector, fueron separados en el gel de agarosa, recortada la banda y purificados con el kit QIAquick Gel extraction (Qiagen) para eliminar la agarosa y las impurezas que puedan quedar (sales, enzimas de restricción). A continuación, se cuantificó tanto el inserto como el vector en el nanodrop y se preparó la reacción de ligación con un ratio de 1:3 vector/inserto, respectivamente en el buffer de ligación. Se añadió el T4 DNA ligasa (TaKaRa) y se incubó la reacción toda la noche en un baño a 16°C . Las ligaciones se transformaron en *E.coli* Stbl2™, usando las indicaciones de la casa comercial (Invitrogen). Por último, se comprobó por PCR la obtención del plásmido con el inserto correcto, usando primers de anillamiento cercanos a la región del inserto, de forma que el tamaño de los amplicones obtenidos nos permitía distinguir entre el vector vacío y el vector que contenía el inserto.

- **Protocolo de Choque Térmico.** Descongelar una alícuota de células competentes en hielo. Se añade todo el volumen de la ligación en el tubo con las células competentes (mezclar con cuidado, con la punta) y se incuba durante 30min en hielo. Choque térmico de las células a 42°C durante 25sec e inmediatamente después se pone la mezcla en hielo durante 2min. Se añade 800 μL de medio LB o Super optimal broth (SOC) pre-calentado y se incuba 1h a 37°C con una agitación constante de 180rpm. Pasado el tiempo de incubación,

se siembra entre 100-500µL en placas de LB-agar (con el antibiótico de selección adecuado, por ejemplo, ampicilina) y se incuba toda la noche (16h aprox.) en una estufa a 37°C. Al día siguiente se comprueba la aparición de colonias.

2.3 Plásmidos utilizados para la obtención de los lentivirus

El Dr Trono y sus colaboradores han desarrollado tres generaciones de vectores para la producción de partículas lentivirales (Trono, 2000). Naldini y sus colaboradores describieron los protocolos de producción de lentivirus en 1996 (Naldini *et al.*, 1996). Los plásmidos usados para la producción de lentivirus que pertenecen a la segunda generación son los siguientes:

- **Vector pEIGW**, usado para sobre-expresión de genes específicos. El vector en sí es el único material genético que se transfiere a las células a las que se dirige, ya que se ha perdido la capacidad transcripcional de la secuencia terminal repetitiva del virus (LTR). La secuencia del vector incluye un cassette transgénico flanqueado por elementos “*cis-acting*”, requeridos para su encapsidación, transcripción reversa e integración en el genoma.
- **Vector pSPAX2**, codifica para las proteínas víricas empaquetadoras. Este vector tiene un promotor muy eficiente (CAG), que permite la expresión de los componentes víricos de empaquetamiento, como son: proteína TAT, DNA polimerasa y Transcriptasa Reversa.
- **Vector pM2G**, codifica para la proteína de envoltura vírica del virus Vesicular Stomatitis (VSV) y promueve la transducción de un amplio número de tejidos y líneas celulares.

3. Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

3.1 Extracción RNA

Para llevar a cabo la RT-PCR, se extrajo el RNA total de las células de glioma siguiendo las instrucciones del manual del kit RNeasy Mini (QIAGEN). Se cuantificaron las muestras en el Nanodrop y se comprobó en un gel de agarosa al 1% que el RNA extraído no estuviese degradado.

3.2 Transcripción Reversa-PCR

Preparación del mix de la transcripción reversa (RT). Se añade 5 μ L H₂O, 4 μ L buffer 10X, 8 μ L dNTPs (25 mM cada uno), 9 μ L MgCl₂ (25 mM), 2 μ L Random Hexamers, 1 μ L Rnase Inhibitor RNasin, 1 μ L enzRT, 10 μ L RNA (contiene 1 μ g RNA), obteniendo un volumen final de 40 μ L.

Proceso. Se prepara el mix, excepto el RNA. Primero, se mantiene el RNA 2min a 90°C, inmediatamente después se ponen los tubos de RNA en hielo y se añade el mix.

RT. La reacción de RT se realiza en el aparato de PCR siguiendo el protocolo siguiente.

25°C	42°C	95°C	4°C
10min	60min	5min	∞

Los productos finales se guardan a -80°C o se continúa con la PCR.

3.3 Real Time PCR

La Real Time PCR se llevó a cabo en un sistema de detección iCycler iQPCR y el programa iQ v.3 y iQ v.5 (BioRad), usando el Master Mix Taq Man Gene Expression (Cat. N. 4369016) y los Gene Expression Assays para amplificar *wee1*, *chk1* y *caspasa-2* humanos, simultáneamente amplificando *gadph* como control de carga (Applied Biosystems). La Real Time PCR cuantitativa se realizó en el Servicio de Proteómica y Genómica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Lleida, usando sondas de genes y primers específicos (Tabla 4).

Nombre del gen	Referencia
<i>wee1</i>	Hs0111938_g1
<i>chk1</i>	Hs00967506_m1
<i>caspasa-2</i>	Hs00892484_m1
<i>gadph</i>	Hs02758991_g1

Tabla 4. Ensayos Taq Man para real-time PCR.

4. Bioquímica

4.1 Western Blotting (WB)

Esta técnica es muy útil para detectar proteínas específicas en una muestra determinada y comparar los niveles de expresión tras distintos tratamientos. Los extractos proteicos de los lisados son separados mediante los gels de poliacrilamida-SDS, dependiendo de su peso molecular.

Lisis celular y cuantificación proteica. Para el análisis proteico, las diferentes líneas celulares se siembran en placas p60 a una confluencia del 60-70% y se dejan crecer durante 24h a 37°C. Posteriormente, se inician los tratamientos y pasado el tiempo de tratado, se lavan las placas dos veces con PBS y se añade 100µL de un

tampón de lisis celular (100mM Tris HCl pH= 6,8, 2% SDS). Las muestras se recogen en tubos eppendorf y son sonicadas durante unos 20s para fragmentar el DNA genómico. Para el análisis de proteínas específicas (por ejemplo, α -fodrin), las células se desenganchan y centrifugan a 600xg 5min. El pellet se lava con PBS y se lisan las células mediante una incubación de 15min en hielo con 60 μ L de buffer Triton (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1X coctel de inhibidores de proteasa (Roche Applied Science)). A continuación se centrifuga la muestra 5min a 16,000xg a 4°C y se recoge el sobrenadante en eppendorf nuevos. Una vez obtenidas las muestras, se cuantifica la proteína total por el método de Lowry (ensayo colorimétrico basado en el sulfato de cobre) utilizando el kit Bio-Rad DC Protein Assay.

Preparación de las muestras. Se preparan las muestras para que tengan la misma cantidad de proteína total y el mismo volumen. Se añade el buffer de carga *Laemmli* y se calientan a 95°C durante 5min y se centrifugan a 5000g durante 1min.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE): el porcentaje de los geles depende del tamaño de la proteína a detectar. El gel de resolución se prepara en 375 μ M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS y finalmente se añade 0.08% *ammonium persulfate* (PSA) y 1 μ g/mL TEMED. Los geles empaquetadores son del 4% ó 5% de poliacrilamida en buffer 125 μ M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.067% PSA y 1.7 μ g/mL TEMED. El buffer de electroforesis contiene 1.44% Glicina, 0.1% SDS y 25mM Tris. Se cargan las muestras, todas ellas con el mismo volumen y concentración (se añade *Laemmli* buffer 1X en los pozos que queden vacíos). Los geles corren a corriente constante a 20-25mA/gel hasta que el frente sale fuera del gel.

Detección de proteínas carboniladas. Las células se tratan durante 24h, se lavan con PBS frío y se suspenden en lisis buffer (125mM Tris pH 6.8, 6%SDS). Luego, se hierven las muestras 5min a 95°C y se centrifugan 5min a 5000g. Se separa un volumen de 10 μ L de muestra al que se le añade 10 μ L de una solución de 10mM DNPH en 10% ácido trifluoroacético (TFA) y se incuba a 25°C durante 10min. Finalmente, se añade 10 μ L de una solución neutralizante (2M Tris-HCl en 30% glicerol, 15% beta-mercapto-etanol). Las muestras se usan para WB siguiendo el protocolo explicado anteriormente.

Transferencia. La proteínas una vez separadas en el gel son transferidas a una membrana PVDF (Immobilon-P, Millipore); previamente activada en metanol, lavada con agua y equilibrada en buffer de transferencia (39mM glicina, 49mM Tris base,

0.0375% SDS, 20% metanol). Se cortan 4 hojas de papel de filtro grueso del mismo tamaño que el gel, se mojan en buffer de transferencia y se colocan en el sistema de transferencia sobre la placa base (ánodo): dos hojas de papel de filtro, la membrana, el gel y dos hojas más de papel de filtro empapado. Se cierra la cubierta para que el electrodo (cátodo) entre en contacto con el sándwich. El dispositivo de transferencia es un sistema Hoefer semi-dry utilizado para transferir las proteínas del gel a la membrana, en este caso de PVDF. El sistema se fija una intensidad de $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$ durante 1h.

Bloqueo. Realizada la transferencia, incubamos nuestra membrana con rojo *Ponceau* (0.1% Ponceau, 5% ácido acético y H_2O hasta 50mL), durante 5min a T^a ambiente, para asegurarnos de que ésta se ha realizado correctamente. Luego, se elimina la tinción con el tampón TBST (20mM Tris HCl pH= 8, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) haciendo varios lavados hasta que la membrana queda totalmente limpia. A continuación, se bloquea la membrana con 20mL de 5% leche en polvo desnatada en TBST durante 1h agitando a T^a ambiente. Pasado el tiempo, se realizan tres lavados de 10min de la membrana con TBST. Para determinados anticuerpos que generan mucho ruido de fondo, el bloqueo se realiza en 5% BSA diluido igualmente en TBST.

Incubación con el anticuerpo primario. La solución del anticuerpo primario se prepara en TBST con 0.02% de azida sódica y se añade el volumen de Ab primario según la dilución indicada por la casa comercial (Tabla 5). Normalmente la incubación tiene lugar toda la noche a $+4^\circ\text{C}$ con agitación constante, aunque para anticuerpos como anti-1,4-dinitrophenyl (DNP) y anti- α -Tubulin la incubación es de 1h ó 20 min a T^a ambiente, ya que la intensidad de la señal es muy fuerte.

Incubación con el anticuerpo secundario. Al día siguiente, se lavan las membranas tres veces, 10min, con TBST y se incuban durante 1h a T^a ambiente en agitación con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase o HRP) diluido en TBST (Tabla 6). Después, se vuelve a lavar tres veces durante 10min con TBST.

Revelado. A continuación, se procede con el revelado mediante el kit quimioluminiscencia EZ-ECL (Biological Industries) o Super Signal West Dura (Pierce), dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Finalmente, se expone la membrana a films Fuji RX a diferentes tiempos en función de la señal emitida en la cámara oscura de revelado y se revelan los films en la reveladora Optimax (Protec, Alemania).

Control de carga. Para comprobar que la carga y la transferencia de las muestras es homogénea a lo largo del gel, realizamos un control de carga. Se realiza el western blot anti- α -tubulina sobre la misma membrana o bien, alternativamente se tiñe la membrana con un colorante llamado azul de naftaleno, siguiendo el procedimiento siguiente: activación de la membrana con metanol durante 5min a constante agitación, lavado de 5min con H₂O seguido de una incubación de 5min con el azul de naftaleno y finalmente, se realizan tres lavados de 5min con una solución de lavado (25% metanol, 7% ácido acético completado con H₂O hasta un volumen final de 50mL) y se deja secar la membrana a T^a ambiente.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa Comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Dilución</i>	<i>Aplicación</i>
Ki-67	Millipore	MAB4190	1:500	IF
Caspasa-9	Cell Signaling	9508	1:1000	WB
Caspasa-3	Cell Signaling	9665	1:1000	WB
Bcl-X	Sigma	B9304	1:500	WB
CAD	Millipore	AB16926	1:1000	WB
GADPH	Abcam	Ab9483	1:10,000	WB
Histone-2-AX (H2AX)	Millipore	05-636	1:500	IF
α-Dinitrophenyl (DNP)^{*1}	DAKO **	V0401	1:500	WB
Thioredoxin-1 (TRX-1)	Thermo Scientific	MA5-14941	1:1000	WB
Thioredoxin-Binding Protein-2 (TBP-2)	Thermo Scientific	PA5-23485	1:1000	WB
Wee1	Cell Signaling	4936	1:1000	WB
Chk1 clone E250	Millipore	04-207	1:1000	WB
Cdk1	Abcam	Ab47594	1:1000	WB
Cdk1 (PY15)	Abcam	Ab18	1:1000	WB
α-Tubulin	Sigma	T5168	1:40,000 1:10,000	WB IF
Mus81	Thermo Scientific	MA1-5837	1:10,000	WB
Survivin	Novus	NB500-201	1:1000	WB

	Biologicals		1:500	IF
TPX-2	Novus Biologicals	NB500-179	1:1000 1:1000	WB IF
Rad51 (14B4)	Novus Biologicals	NB100-148	1:1000 1:1000	WB IF
Caspasa-2 (11B4)	Enzo Life Sciences	2224	1:500	WB
DR4	ProScience	PSI-1801	1:500	WB
DR5	ProScience	PSI-1801	1:500	WB
DcR1	ProScience	PSI-1801	1:500	WB
DcR2	ProScience	PSI-1801	1:1000	WB
Caspasa-8 (1C12)	Cell Signaling	9746	1:1000	WB
Caspasa-6	Cell Signaling	9762	1:1000	WB
Caspasa-7	Enzo Life Sciences	ADI-AAM-127	1:1000	WB
FLIP	Sigma	F9800	1:1000	WB
Bcl-2	Sigma	B3170	1:500	WB
Bak, NT	Millipore	06-536	1:500	WB
Bax	Sigma	B3428	1:500	WB
Bad	Sigma	B0684	1:500	WB
Bid	Sigma	B4305	1:250	WB
Bag1	BD Biosciences	S1-9002671	1:15,000	WB
Cdc25a ^{*2}	Sta.CruzTechn ^{**}	Sc-97	1:500	WB
p21 ^{*3}	Sta.CruzTechn ^{**}	Sc-397	1:1000	WB
Cyclin B1	Abcam	Ab32053	1:3000	WB
α-Spectrin (α-Fodrin) ^{*4}	Millipore ^{**}	MAB-1622	1:30,000	WB

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot e Inmunofluorescencia.

IF: Inmunofluorescencia; WB: Western Blot

** Amablemente cedido por Joaquim Ros¹, Judit Herreros², Eloi Gari³ y Judit Ribas⁴

Universidad de Lleida

Anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Dilución	Aplicación
Mouse IgG-HRP	Sigma	A9046	1:10,000	WB
Rabbit IgG-HRP	Sigma	A0545	1:10,000	WB
Goat IgG-HRP	Sigma	A9046	1:20,000	WB
Mouse IgG AlexaFluor 594	Molecular Probes	A11005	1:500	IF
Mouse IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A11029	1:500	IF
Rabbit IgG Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A11034	1:500	IF

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot e Inmunofluorescencia.

IF: Inmunofluorescencia; WB: Western Blot

4.2 Análisis de la degradación del ADN por electroforesis -CHEF y LADDER

El método de electroforesis CHEF te permite analizar la degradación del ADN de alto peso molecular que no puede ser observada en geles de electroforesis convencionales. El aparato utilizado es el CHEF-DRII System (BioRad) y te permite separar fragmentos de 5Kb a 6Mb.

El procedimiento se basa en aplicar un campo eléctrico homogéneo controlado que cambia de dirección en un ángulo predeterminado (120°C) a las muestras de ADN sumergidas en el gel. Este ángulo ya preestablecido es el idóneo para separar fragmentos de 100Kb a 6Mb. Así entonces, el ADN se puede reorientar y mover a diferente velocidad cada vez que cambia el campo eléctrico.

Cultivo celular. Células de las tres líneas de glioma se siembran en placas p60 a un 70% de confluencia y se dejan crecer 24h a 37°C. Posteriormente, se aplican los diferentes tratamientos farmacológicos durante 24h ó 48h.

Recogida de muestras. Después de aplicar los tratamientos, se recogen las células. Para ello, usamos un rascador con el cual levantamos la monocapa de células

junto con el medio y se transfiere a un tubo de centrifuga. Para terminar de recoger todas las células, se lava la placa con 1mL PBS frío y toda la suspensión recogida se centrifuga 5min a 200g. Luego, se lava el pellet en 1mL PBS frío y se transfiere a un tubo eppendorf, se vuelve a centrifugar 3min a 5000g 4°C, y se vuelve a lavar el pellet con PBS.

Preparación de las muestras. Para poder realizar el análisis hay que hacer unos bloques de agarosa que contengan las células obtenidas en el paso anterior. Estas muestras contienen aproximadamente 2×10^6 células, que se suspenden en 40 μ L PBS y se calientan 5min a 60°C. Seguido, se añaden 40 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (*Agarose Low Melting point*, Sigma) al 1% en TBE 1X mantenida en un baño a 60°C. Una vez homogeneizada la muestra, se transfiere todo el volumen a un molde de inserción y se deja enfriar en hielo aproximadamente 30min. Una vez las muestras han solidificado, se transfieren los bloques, de forma individual, a tubos eppendorf y se incuban en 1mL de buffer de lisis NDS (10mM Tris, 0.5M EDTA, 1% Lauril Sarcosil) al cual se le añade justo en ese momento la proteinasa K (100 μ g/mL). La digestión se deja 24h en un horno de hibridación a 50°C en agitación suave. Cuando ha pasado el tiempo, se obtienen dos muestras diferentes: el bloque de agarosa nos servirá para el análisis de la fragmentación de ADN de alto peso molecular, y el buffer que servirá para el análisis de la fragmentación de ADN de bajo peso molecular, también conocido como *ladder*.

- Análisis de CHEF o fragmentación de alto peso molecular. Se lavan los bloques de agarosa dos veces con buffer TBE 0.5X (TBE 5X: 45mM Tris, 45mM Borato, 1mM EDTA pH 8.3) a T^a ambiente y en constante movimiento durante 1h cada lavado. Mientras se prepara el gel de agarosa para el CHEF (*Agarose for pulsed field electrophoresis*, Sigma) al 1% en TBE 0.5X. Una vez pasado el tiempo de lavados, se cargan los bloques en el gel de agarosa y se sellan con agarosa de bajo punto de fusión. Previamente, el aparato de CHEF se pone en funcionamiento, añadiendo 2L de TBE 0.5X y dejando que llegue a la temperatura de 14°C. Una vez el sistema está a punto, se pone a correr el gel durante 14 horas, a 14°C, a un voltaje constante de 6V/cm, y un tiempo inicial y final de 5-50 segundos respectivamente. Una vez finalizado, se tiñe el gel con SYBR Safe (1:10,000) en TBE 0.5X en agitación suave y se observan las

bandas en el transiluminador de luz ultravioleta (254-360nm) tomando la imagen con la cámara fotográfica.

- Análisis de ladder o fragmentación de bajo peso molecular. Se recupera el buffer de lisis de la incubación con los bloques de agarosa y se mezcla con el mismo volumen de 100% EtOH (-20°C). Se mezcla por inversión y se deja toda la noche a -20°C para que precipite el ADN. Al día siguiente, se centrifuga la muestra durante 15min a 16,000g, se lava el pellet en 1mL 70% EtOH y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Luego, se deja secar el precipitado durante 1-2 horas (hasta que vemos que se vuelve transparente). Una vez seco, se suspende el precipitado en 10µL de buffer TE (10mM Tris/HCl pH 7.5, 1mM EDTA) y se incuba durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se calientan las muestras durante 5min en un baño a 60°C para garantizar que el ADN se disuelva bien. Además, se prepara un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X con SYBER Safe (1:10,000) y las muestras se cargan con 4µL de Orange G (Orange G: 10mM Tris, 10mM EDTA, 30% Glicerol). Se inicia la electroforesis a 150V hasta que el frente está prácticamente llegando al final del gel. Entonces se observa el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y se toma la foto con la cámara.

5. Biología Celular

5.1 **Inmunofluorescencia (IF)**

La inmunofluorescencia es una técnica que emplea anticuerpos conjugados a fluorocromos, para visualizar la distribución de una proteína específica en células o secciones de tejidos. El marcaje inmunofluorescente se puede realizar en células fijadas sobre el plástico de cultivo o creciendo sobre cubreobjetos de vidrio.

Las muestras marcadas inmunofluorescentemente las hemos visualizado bajo un microscopio de fluorescencia Olympus IX70 conectado a una cámara digital y/o en un microscopio confocal Olympus FluoView™ FV500.

Cultivo celular. Las líneas U87-MG, U251-MG y LN229 se siembran en placas de 4 pozos (M4, Nunc) a una densidad de 3,000 células/pozo (U87-MG y LN229) y

1,500 células/pozo (U251-MG) con medio DMEM-10% FBS. Tras 24h, se tratan con los fármacos: 10 μ M SAHA, 10mM VPA, 100 μ M TMZ, 100 μ M Menadiona, o con los compuestos 15mM N-acetil-cisteína (NAC) ó 10mM glutatión (GSH), según el experimento. Las células se incuban a diferentes tiempos, 24h ó 48h. Para experimentos que van a ser visualizados en microscopio confocal es necesario poner cubres en cada uno de los pozos. Los cubres se esterilizan con 70% etanol y se dejan secar en los pozos de la placa M4 antes de sembrar las células.

Fijación y Bloqueo. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se fijan las células durante 20min con 4% Paraformaldehído (PFA) en PBS. Las células fijadas se lavan con PBS y se bloquean con solución de bloqueo (5% FBS, 5% BSA, 0.1% Triton X-100 en PBS) durante 1h agitando a T^a ambiente.

Incubación con los anticuerpos. Después se incuba, durante 1h en agitación a T^a ambiente, con el anticuerpo primario (Tabla 5) diluido en solución de bloqueo, y seguidamente se hacen 2 lavados de 5min con solución de bloqueo. A continuación, se incuba, durante 1h agitando a T^a ambiente, con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla 6) junto con las sales de bisbenzimidazolo Hoechst 33342 (1 μ g/mL) diluido en solución de bloqueo. Finalmente se realizan 3 lavados con PBS.

Montaje. Si las muestras van a ser analizadas en el microscopio de fluorescencia, se monta cada muestra con una gota de Vectashield y se cubre con un cubreobjetos. Si por el contrario las muestras son para visualizar en el microscopio confocal, el último lavado se hace con H₂O y el cubre se coloca sobre un portaobjetos, añadiendo previamente 7 μ L de 9% Mowiol 4-88 en 0.1M Tris pH 8.5, 25% glicerol, 0.01% p-pheylenediamine (PPD, Sigma).

5.2 Ensayos de Viabilidad

El estudio de la viabilidad y proliferación celular es un factor importante para evaluar las respuestas de una población celular a factores externos como factores de crecimiento, antibióticos o compuestos citotóxicos.

5.2.1 Ensayo de Azul de Tripano

Este ensayo se utiliza para hacer un conteo directo de la viabilidad celular puesto que es una tinción que permite diferenciar las células muertas de las células vivas. La característica fundamental es la tinción con azul de tripano de las células muertas mientras que las células vivas excluyen el colorante. Por ello, bajo un microscopio en la cámara de Bürker las células muertas se distinguen por su color azulado mientras que las células vivas se mantienen intactas permitiendo así calcular el % de células muertas respecto a células totales. Además, se puede calcular el número total de células del pocillo.

Cultivo celular. Las diferentes líneas se siembran en placas de 6 pozos (M6) (Figura 23) a una densidad del 50% de confluencia y se cuentan las células en una cámara de Bürker para conocer el número de células sembradas inicialmente.

Después de 24h, las células se tratan con los inhibidores: 10 μ M SAHA, 10mM VPA, 5 μ M Q-VD-OPh y se incuban durante 48h a 37°C.

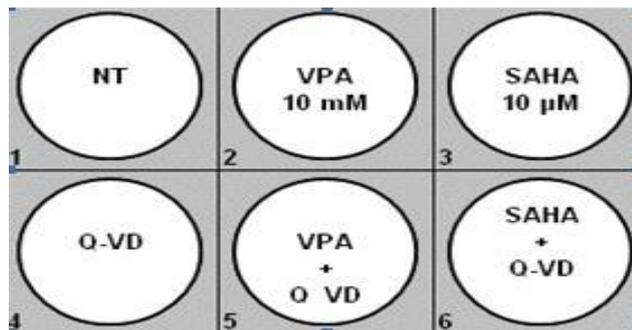


Figura 23. M6/línea con los diferentes HDACi.

Tinción con Azul de Tripano. Pasado ese tiempo, se procede con la tinción con azul de tripano (Gibco 15250). Se lavan las células con PBS; y se tripsinizan. Después se recoge la suspensión celular y se centrifuga 3min a 1,100rpm 4°C. El pellet se resuspende en volúmenes distintos de medio en función de su tamaño: NT 100 μ L; Q-VD 90 μ L; y el resto 60 μ L. Finalmente se hace la tinción con azul de tripano añadiendo a un tubo 10 μ L de suspensión celular, 20 μ L de PBS y 10 μ L de 0.04% azul de tripano y se realiza el conteo, células muertas vs células totales, en la cámara de Bürker.

5.2.2 Ensayos de Viabilidad y Dosis-Respuesta (DR)

El reactivo WST-1 (basado en sales de tetrazolium) permite analizar de una forma indirecta la viabilidad y proliferación celulares.

Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la reducción de las sales de tetrazolium, WST-1, a sales de formazán mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales (Figura 24).

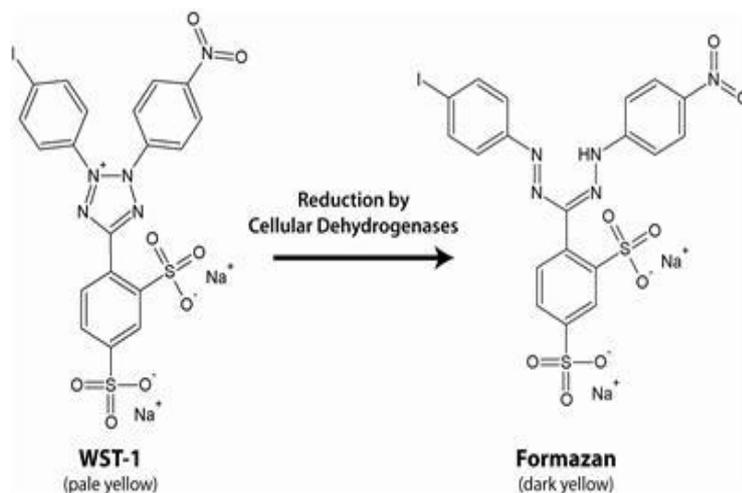


Figura 24. Reacción química que se produce al añadir la sal WST-1. La formación del formazán (coloración intensa) está directamente correlacionada con la densidad celular.

Cultivo celular. Se siembran las líneas celulares en placas de 96 pozos (M96) a una densidad de 4,000 células/pozo (U87-MG, LN229) y 2,500 células/pozo (U251-MG) y se dejan crecer durante 24h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se tratan las células 48h con diferentes concentraciones de los compuestos testados: SAHA (2.5; 5; 10; 20µM); TRAIL (25; 50; 100; 250 ng/mL); VPA (5; 10; 15; 20 mM); TMZ (25, 50, 100, 250 µM) en presencia o no del inhibidor de caspasas Q-VD-OPh (5 µM), dependiendo del tipo de experimento.

Ensayo WST-1. Se prepara una dilución de WST-1 (1:10) con medio DMEM-10%FBS; después de aspirar el medio de cada pozo (con una aguja de jeringa para evitar llevarnos las células), se añade 100µL del reactivo diluido y se deja incubar a 37°C. Las lecturas se realizan a tiempos de 30min, 1h, 2h y 3h; en un lector de placas multipozo Biotek utilizando el filtro de 450nm y el de 650nm; y los resultados se recogen en una hoja Excel para proceder con los respectivos cálculos.

5.3 Ensayos de Clonogenicidad

El propósito de este tipo de ensayos es determinar el efecto de los inhibidores HDAC sobre la adhesión y proliferación celular. Se trata de evaluar si una célula es capaz de dividirse y formar clones, después de haber sido expuesta a un tratamiento.

Cultivo celular. Se siembran 3 placas de 35mm de diámetro (p35) para cada línea celular a una densidad de: 700,000 células/pozo U87-MG; 350,000 cél/pozo U251-MG y 600,000 cél/pozo LN229 y se incuban durante 24h. Al día siguiente, se inician los tratamientos: NT; 10mM VPA y 10 μ M SAHA; y se incuban durante 48h a 37°C. Pasado ese tiempo, se lavan las células con PBS, se tripsinizan y se centrifugan 3min a 200g, 4°C. El pellet se diluye en 0.5mL de medio de cultivo y se cuentan las células de las diferentes líneas/tratamientos en la cámara de Bürker, después de una tinción con azul de tripano. A continuación, sembramos en placas de 6 pozos a una densidad de 500 células vivas/pozo, cada condición se hace por duplicado; y se dejan en el incubador a 37°C/5% CO². A los 6 días, renovamos el medio de cultivo (sin tratamientos) y dejamos crecer hasta el día 10-11, en el cual, fijaremos y teñiremos las células.

Tinción con cristal violeta. Colocamos las placas en hielo, lavamos con PBS 1X y fijamos las células con metanol frío durante 10min. A continuación, eliminamos el metanol y añadimos la solución de cristal violeta (0.5% cristal violeta en 25% metanol) e incubamos 10min a T^a ambiente. Finalmente, eliminamos la mayor cantidad posible de la solución y lavamos con agua destilada y dejamos secar toda la noche. Al día siguiente, contamos los clones formados de las diferentes condiciones/líneas.

5.4 Citometría de flujo (CMF)

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparametrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas de una en una por delante de un haz de láser focalizado. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un fino tubo sobre el que incide un rayo de luz láser. La luz transmitida y dispersada por el paso de las células a través del tubo, se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo diferenciar estas

células en cuanto a tamaño y complejidad. Esta técnica permite la medida simultánea de múltiples características físicas de una sola célula.

5.4.1 Análisis del Ciclo Celular

La CMF se puede emplear para estudiar características tanto estructurales como funcionales de las células. Una de estas aplicaciones es el estudio de las fases del ciclo celular. En este experimento hemos trabajado con el ioduro de propidio (PI) como fluorocromo. Es una molécula que se utiliza como marcador del contenido de ADN y ARN. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo, que a su vez es proporcional a la cantidad de ADN de la célula.

Cultivo celular. Las células se siembran en placas p35 a una densidad entre 3.5-7x10⁵ células por placa y se dejan a 37°C durante 24h. Pasado este tiempo, se inician los tratamientos de 24h: 100ng/mL TRAIL, 10mM VPA y 10μM SAHA.

Recogida de muestras. Las células se lavan con PBS, se tripsinizan y se centrifugan 3min a 200g. El pellet se lava con PBS frío, se suspende en PBS y se añade Etanol 100% (-20°C) para obtener una concentración final del 70%, se invierten los tubos un par de veces y se vortean para asegurarnos de que se mezclen y fijen correctamente las células. Finalmente, se guardan las muestras a -20°C un mínimo de 30 min o hasta el día que se analicen en el CMF.

Tinción con el PI y Análisis por citometría de flujo. El día del análisis las muestras se lavan con PBS frío dos veces, se centrifuga 5min a 200g 4°C y se suspende el pellet en PI (generalmente en un volumen de 500 μL, pero hay que adecuar el volumen según la densidad celular) y se incuba 30min a 37°C. La distribución del ciclo celular se analiza usando el citómetro BD FACSCantoII (Becton Dickinson).

5.4.2 Análisis de la producción de ROS

Otra de las utilidades del citómetro de flujo es el análisis del estado REDOX de las células. En este experimento hemos utilizado una sonda fluorogénica, *Cell ROX Green Reagent* (Life Technologies) que nos sirve para medir el estrés oxidativo en células vivas. Este marcaje es débilmente fluorescente en un estado reducido de las células mientras que presenta una fluorescencia verde fotoestable tras la oxidación por las especies reactivas del oxígeno y posterior unión al ADN, con una absorción/emisión máxima de ~485/520nm.

Cultivo celular. Se siembran las células a una densidad entre $3.5-7 \times 10^5$ células por p35 y se incuban a 37°C durante 24h. Al día siguiente, se inician los tratamientos de 24h: 10mM VPA, 10µM SAHA, 10µM SAHA en presencia de 10mM GSH.

Marcaje de las células y Análisis en el citómetro. El día del análisis, se inicia el tratamiento con 100µM menadiona en una de las p35 de cada línea celular. Pasados 30min, se añade el reactivo, *Cell ROX Green Reagent*, a una concentración final de 2.5µM (stock 2.5mM) y se incuba 30min a 37°C. Luego, se lavan las células con PBS frío, se tripsinizan y se centrifugan 3 min a 200g 4°C. Finalmente, el pellet se suspende en 1mL de PBS frío y se bajan seguidamente a analizar en el citómetro.

5.4.3 Ensayo Annexina V y Ioduro de Propidio

Este ensayo nos permite cuantificar el número de células muertas que mueren por apoptosis o por otro tipo de muerte no-apoptótica. Se utiliza el anticuerpo contra Annexina V (Enzo Life Sciences) para marcar las células apoptóticas, ya que se trata de una proteína que se une a estas células de forma dependiente de calcio. Annexina V, se une a fosfatidilserina normalmente presente en la cara interna de la membrana plasmática de las células, pero que se expone a la superficie celular tras iniciarse la muerte por apoptosis. Por otro lado, se utiliza el ioduro de propidio (BD Transduction Laboratories) para identificar el total de las células muertas en una población, células con la membrana plasmática dañada.

Marcaje de las células y Análisis en el citómetro. Las células se siembran a una densidad de $3.5-7 \times 10^5$ células por p35. Al día siguiente las células se tratan durante 24h con 10µM SAHA. Para la tinción, se tripsinizan las células y se centrifugan. Una de las muestras se trata 3min con 70% EtOH (control positivo) y se divide en tres partes: una parte sin teñir, otra teñida únicamente con PI y otra con AnnexinaV. El pellet de células se lava dos veces con PBS 1X y las muestras se incuban con 1µg/mL AnnexinV-FTIC y 2.5µg/mL PI en 200µL buffer (10mM HEPES/KOH pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂) durante 20min a T^a ambiente. Inmediatamente después, se analizan las muestras en el citómetro de flujo.

5.5 Ensayo Actividad Caspasa

Se trata de un ensayo fluorométrico que utiliza la actividad enzimática de la caspasa, y un sustrato especialmente diseñado para generar una señal fluorescente después de su corte proteolítico. Esta señal puede ser leída por un fluorímetro de microplacas Bio-Tek FL600 (Izasa).

Cultivo celular. Las células se siembran en p35 a una densidad entre $3.5-7 \times 10^5$ células por placa y se dejan a 37°C. Al día siguiente, se tratan las células con 10mM VPA y 10μM SAHA, en presencia o ausencia de 5μM Q-VD-OPh, durante 24h.

Recogida y Cuantificación de muestras. Las células se lisan con 60μL de buffer de lisis que contiene 20mM HEPES/NaOH pH 7.2, 5mM MgCl₂, 1%PMSF, 1% Triton X-100, 5mM EDTA y 10mM DTT. La concentración de proteína de los lisados se cuantificó con el ensayo Lowry (BioRad).

Análisis de la Actividad Caspasa. Las muestras se preparan con la misma cantidad de proteína total (50μg) y se les añade el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC (Millipore) para la actividad caspasa-3 o Ac-VDVAD-AF (Enzo Life Sciences) para la actividad caspasa-2; ambos a una concentración final de 50μM y se transfieren a los pozillos de una placa M96. La placa se incuba a 37°C y la fluorescencia se mide en intervalos de 1 hora durante las próximas 8 horas en el fluorímetro Bio-Tek FL600 con un filtro de excitación de 360nm ó 400nm y un filtro de emisión de 530nm ó 505nm, para caspasa-3 o caspasa-2, respectivamente.

6 Herramientas Bioinformáticas

6.1 pDRAW32

pDRAW32 es un programa gratuito desarrollado por AcaClone Software que permite hacer representaciones gráficas de las secuencias de ADN y facilita el diseño de estrategias de clonación y el análisis de restricción del ADN.

<http://www.acaclone.com>

6.2 Image J

Image J es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java. Esta aplicación permite visualizar y manejar imágenes obtenidas a partir de cualquier microscopio, incluso el microscopio confocal. Es muy útil, ya que permite editar o dar color a cualquier imagen, cuantificar intensidades, seleccionar regiones de interés, llevar a cabo análisis de colocalización entre otras muchas funciones (Abràmoff *et al.*, 2004).

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>

RESULTADOS



Parte 1

Los HDACi inducen muerte por apoptosis mediada por catástrofe mitótica en células de glioma.

1. Sensibilidad de las células de glioma a los inhibidores de las HDAC: VPA y SAHA

Los ensayos de viabilidad celular permiten medir el porcentaje de células vivas después de aplicar un tratamiento farmacológico y, por lo tanto, es una herramienta muy útil para estudiar la eficacia de tratamientos anti-tumorales.

A lo largo de este proyecto se han realizado tratamientos con los inhibidores farmacológicos de las HDAC, que nos han permitido determinar sus efectos sobre la expresión de diferentes proteínas, así como también evaluar qué efectos celulares provocaba su uso. Para ello, primero era necesario caracterizar la respuesta celular a diferentes concentraciones del fármaco y determinar así qué dosis era la más apropiada para los posteriores experimentos.

1.1 **Ensayo de Viabilidad basado en las sales WST-1**

En primer lugar, se ha utilizado el ensayo basado en la degradación de las sales de WST-1 mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales; permitiendo así una medida indirecta del número de células vivas.

En este estudio se ha trabajado con diferentes concentraciones de VPA y SAHA. Las tres líneas celulares de glioma, U87-MG, U251-MG y LN229, se trataron durante 48h a diferentes concentraciones del fármaco: VPA (5mM, 10mM, 15mM, 20mM) y SAHA (2.5µM, 5µM, 10µM, 20µM). Los resultados de las lecturas espectrofotométricas a 450nm (filtro de referencia a 650nm) son referidos a los pocillos de células no tratadas y los resultados fueron recogidos en las siguientes figuras (Figura 25):

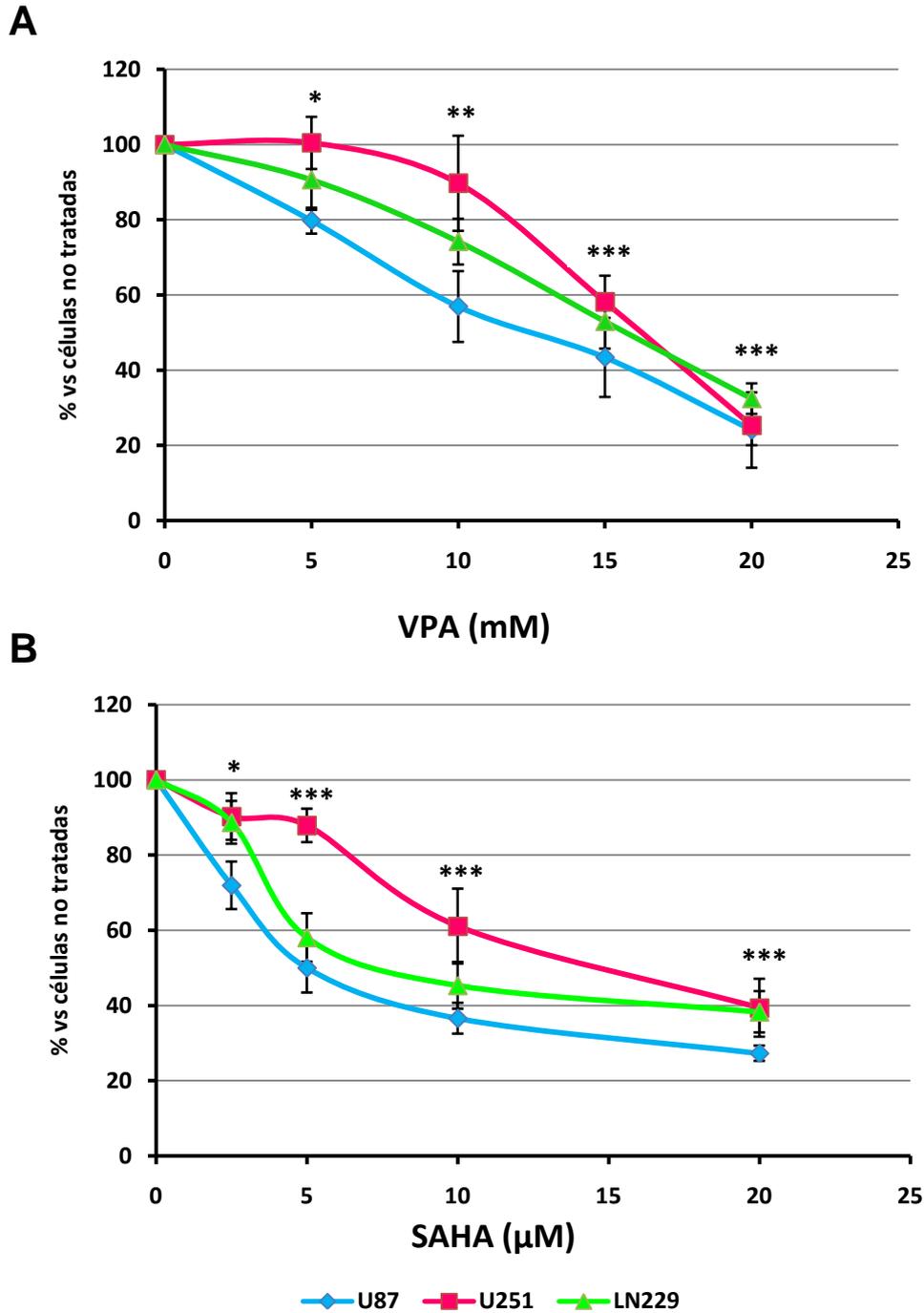


Figura 25. Dosis-Respuesta de las líneas de glioma al tratamiento con los HDACi. Las tres líneas celulares, U87-MG, U251-MG y LN229, se sometieron a los tratamientos farmacológicos a diferentes concentraciones: **A)** VPA y **B)** SAHA, durante 48h y se realizó el ensayo de viabilidad con WST-1. Los resultados observados son el resultado del promedio de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test t-student comparando las células más resistentes (U251-MG) con las más sensibles (U87-MG), siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En las gráficas anteriores podemos ver representados el porcentaje de células vivas tratadas respecto a las células no tratadas (NT) (eje Y), a diferentes concentraciones de los inhibidores farmacológicos, VPA y SAHA (eje X).

Con lo que respecta a VPA (Figura 25A), vemos que las células de glioma son sensibles a este inhibidor de las HDAC. Se observa una disminución significativa de la viabilidad celular a partir de una concentración de 10mM para las líneas U87-MG y, sin embargo, la línea U251-MG muestra una mayor resistencia a esta misma concentración. A medida que aumenta la concentración de inhibidor observamos una disminución de la viabilidad de forma dosis-dependiente. Por consiguiente, las concentraciones de VPA que se han utilizado en los siguientes experimentos son de 10mM y 15mM, en función del experimento.

Por último, el tratamiento de células de glioma con SAHA (Figura 25B) causa también una disminución de la viabilidad celular de forma dosis-dependiente en las tres líneas analizadas. A partir de la concentración de 5 μ M se observa una importante disminución de la actividad mitocondrial del pocillo, excepto para la línea U251-MG que muestra mayor resistencia al tratamiento con una viabilidad de aproximadamente el 90% respecto a menos del 60% para las otras dos líneas de estudio. A partir de la concentración de 10 μ M las diferencias entre las distintas líneas de glioma disminuyen aunque se observan diferencias significativas entre las células U251-MG y U87-MG y la mortalidad no aumenta demasiado entre 10-20 μ M, excepto para la línea U251-MG. La concentración de SAHA se ha fijado en 10 μ M para los posteriores experimentos.

1.2 Ensayo de Viabilidad celular mediante tinción con Azul de Tripano

Para completar estos resultados se realizó un ensayo usando el azul de tripano como colorante. Este tipo de estudio permite analizar de una forma directa la viabilidad celular. Las células vivas no se colorean ya que tienen una membrana celular intacta, por lo que, este colorante penetrará únicamente en células muertas pudiéndolas diferenciar fácilmente bajo un microscopio.

En este ensayo se escogieron las dos concentraciones de trabajo, ya fijadas tras realizar el ensayo anterior de dosis respuesta: 10mM VPA y 10 μ M SAHA; usándose

como control células no tratadas (NT). Las tres líneas de glioma, U87-MG, U251-MG y LN229, se trataron con ambos inhibidores durante 48h. Pasado ese tiempo, se realizaron los contajes en la cámara de Bürker (células muertas teñidas en azul). Los resultados se recogieron en la siguiente figura 26, donde el eje Y representa el porcentaje de células vivas mientras que el eje X, muestras las tres líneas con las diferentes condiciones de tratamiento.

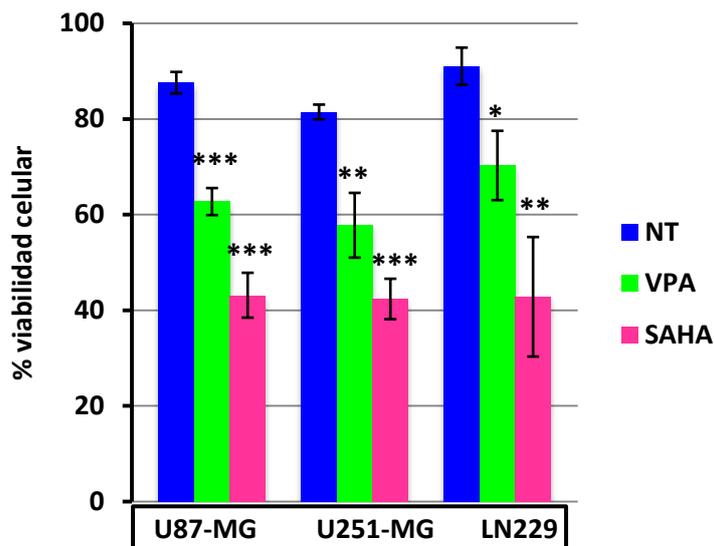


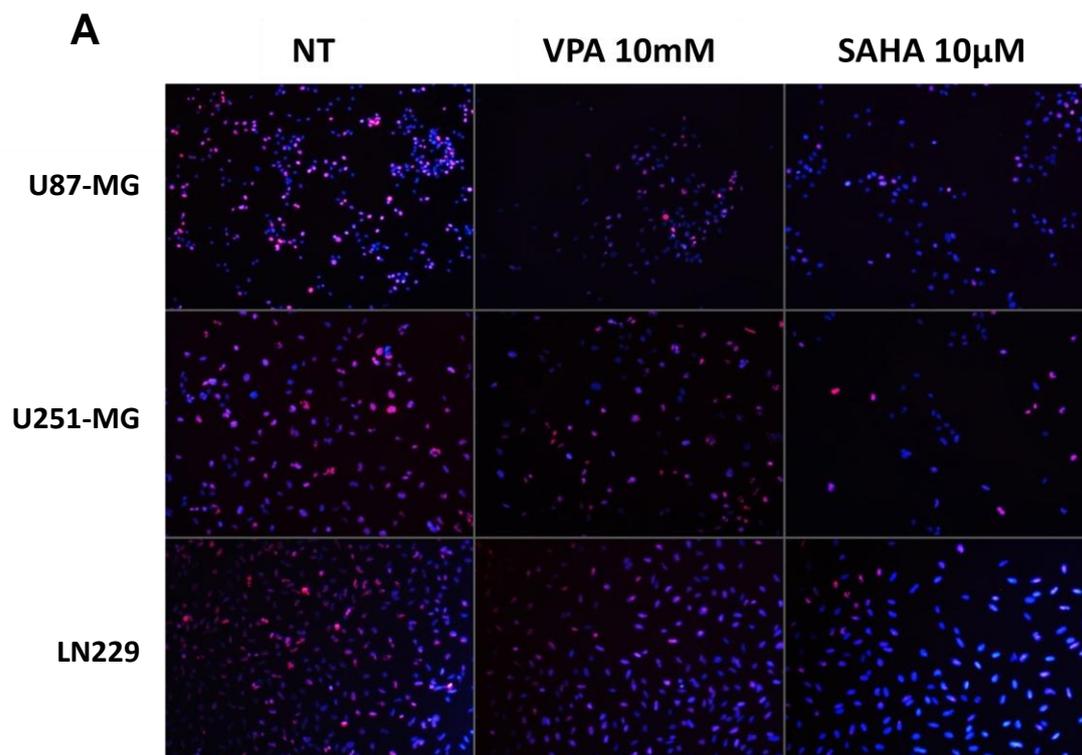
Figura 26. Contaje celular directo mediante exclusión con azul de tripano. Las tres líneas de glioma fueron tratadas durante 48h con los dos inhibidores de las HDAC a las concentraciones de trabajo fijadas, 10mM VPA y 10µM SAHA. Los resultados observados son el promedio de 5 experimentos independientes. NT: no tratado. Análisis estadístico con el test t-student siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En este experimento podemos observar, que a las concentraciones elegidas para los tratamientos con los HDACi, tenemos resultados similares a los obtenidos en el ensayo indirecto de viabilidad mediante las sales WST-1. Así pues, vemos que en las tres líneas celulares de glioma hay una disminución significativa de la viabilidad celular con ambos inhibidores farmacológicos, siendo más efectivo el tratamiento con 10µM SAHA, que reduce la viabilidad en casi un 50%.

2. Determinación del efecto de los inhibidores de las HDAC en la proliferación celular de las tres líneas de glioma

Un marcador de proliferación celular muy utilizado en el diagnóstico en distintos tipos de tumores es Ki-67, una proteína nuclear relacionada con el ciclo celular, se encuentra expresada en todas las fases activas de proliferación del ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis), pero no en G0. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal Ki-67 permite la detección por inmunofluorescencia de células que progresan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de células en crecimiento.

En este ensayo hemos analizado cómo afectan los HDACi a la expresión de Ki-67 en células tratadas durante 48h con 10mM VPA y 10 μ M SAHA (Figura 27).



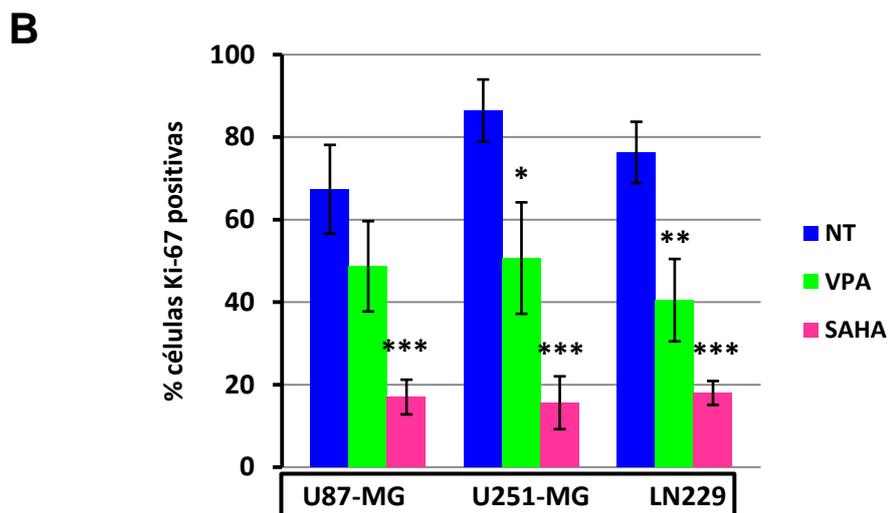


Figura 27. Análisis de la proliferación celular mediante el conteo de células positivas para Ki-67 tras 48h de tratamiento con los HDACi. A) Imágenes representativas de los resultados obtenidos de la detección de Ki-67 por inmunofluorescencia en células de glioma tratadas con 10mM VPA ó 10 μ M SAHA durante 48h. Las células positivas para Ki-67 presentan marcaje rojo y los núcleos se visualizan con Hoechst en azul. **B)** Porcentaje de células positivas para Ki-67. Estos resultados son los promedios con errores estándar obtenidos de 4 experimentos independientes. NT: no tratado. Análisis estadístico con el test t-student siendo * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

En la figura 27A, podemos ver que las células tratadas con ambos HDACi tienen un menor número de células que expresan Ki-67 (rojas) con respecto a las células no tratadas. En la figura 27B se muestran los resultados obtenidos de los conteos y se observa que SAHA reduce el porcentaje de células que están proliferando de un rango entre 70-80% a un porcentaje menor del 20% en las tres líneas celulares. Con el tratamiento con VPA, también se observa una disminución en la proliferación de las células, reduciéndose hasta un 40-50%; pero el efecto es menor comparado con SAHA.

3. Análisis de la clonogenicidad de las células de glioma tras el tratamiento con los inhibidores de las HDAC

Se determinó si los inhibidores de las HDAC afectaban a la capacidad de crecer formando clones en las tres líneas celulares de glioma, U87-MG, U251-MG y LN229. Las células fueron tratadas durante 48h, con los inhibidores farmacológicos de las HDACs: 10mM VPA y 10 μ M SAHA.

En la imagen 28A, se observan los clones formados para cada tipo de línea celular después de una tinción con 0.25% cristal violeta. La línea U87-MG forma clones poco definidos, en los que las células están más dispersas. Sin embargo, en las otras dos líneas, U251-MG y LN229, los clones están bien definidos, siendo en consecuencia más pequeños en tamaño. Para las tres líneas analizadas, se observa una clara disminución del número de clones generados tras el tratamiento con los HDACi.

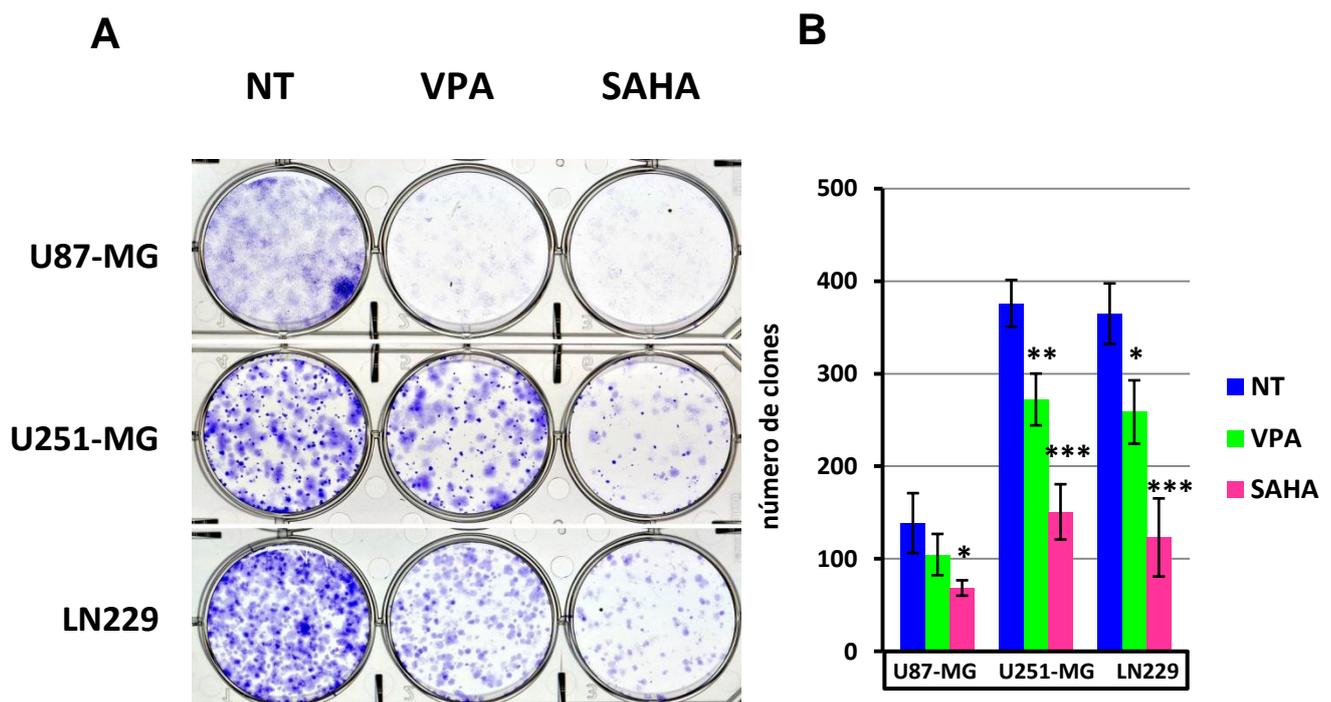


Figura 28. Los inhibidores de las HDAC producen una disminución significativa en la capacidad de las tres líneas de glioma para formar clones. A) Representación de los clones formados a las 48h de exposición a los HDACi. B) Los datos muestran una clara disminución en la formación de clones a las 48h de tratamiento, tanto con 10mM VPA como con 10 μ M SAHA. Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes. NT: no tratado. Análisis estadístico con el test t-student siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En el caso del tratamiento con 10mM VPA, la capacidad de formar clones disminuye significativamente en un 15-20% (Figura 28B), mientras que 10 μ M SAHA tiene un mayor efecto en las tres líneas de glioma, produciendo una disminución de aproximadamente un 40%.

4. Caracterización de los efectos de los HDACi en la morfología nuclear

Como hemos observado en los apartados anteriores, tanto VPA como SAHA, producen una disminución de la proliferación y un descenso en la viabilidad de las células de glioma. Por ello, para seguir caracterizando más en profundidad los mecanismos que conllevan finalmente a estos efectos, nos propusimos analizar si los HDACi provocaban la muerte por apoptosis analizando la morfología nuclear de las tres líneas de glioma. Como inductor de la apoptosis utilizamos TRAIL a una concentración de 100ng/mL.

Se analizó la morfología nuclear de células tratadas 24h con 10mM VPA y 10 μ M SAHA mediante la tinción nuclear con Hoechst 33342 y microscopía de fluorescencia, y en la figura 29 se muestran imágenes representativas:

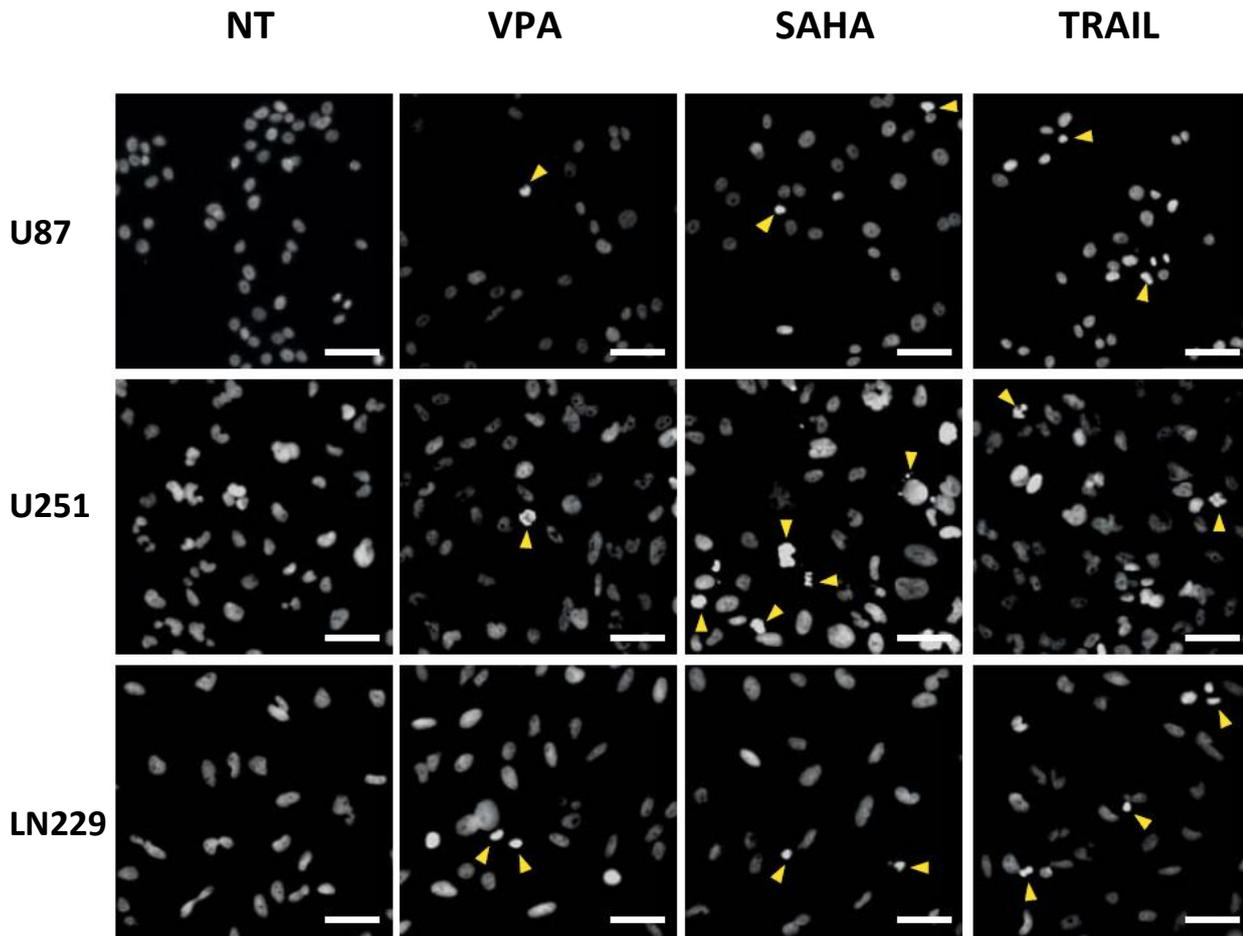


Figura 29. VPA y SAHA producen condensación nuclear. En las imágenes se muestra la morfología nuclear de las líneas U87-MG, U251-MG y LN229 después de 24h de exposición a los siguientes tratamientos: 10mM VPA, 10µM SAHA ó 100ng/mL TRAIL. Después del tratamiento, las células se fijaron en 4%PFA y los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Las flechas amarillas indican núcleos anormales y condensados. Barra de escala: 50µM. NT: no tratado.

En las imágenes se observa que los inhibidores de las HDAC producen condensación nuclear y también aparecen morfologías nucleares anormales. Sin embargo, no aparece fragmentación nuclear, que es una característica muy típica en células apoptóticas. Importante destacar que esta fragmentación nuclear difícilmente se observa en células tratadas con TRAIL, lo cual indica que las células de glioma tras la activación de la vía extrínseca de la apoptosis no llegan a realizar la fragmentación nuclear típica.

5. Determinación de la implicación de la vía apoptótica mitocondrial: análisis y expresión de la activación de las caspasas -3 y -9

Para determinar si la vía intrínseca de la apoptosis se activa tras los tratamientos con los HDACi, analizaremos por la técnica de western blot la expresión y activación por corte de las principales caspasas de esta vía: caspasa-9 y caspasa-3.

Las células se sometieron a 24h de tratamientos con 10mM VPA y 10 μ M SAHA. Los resultados obtenidos por WB se muestran en la siguiente figura 30:

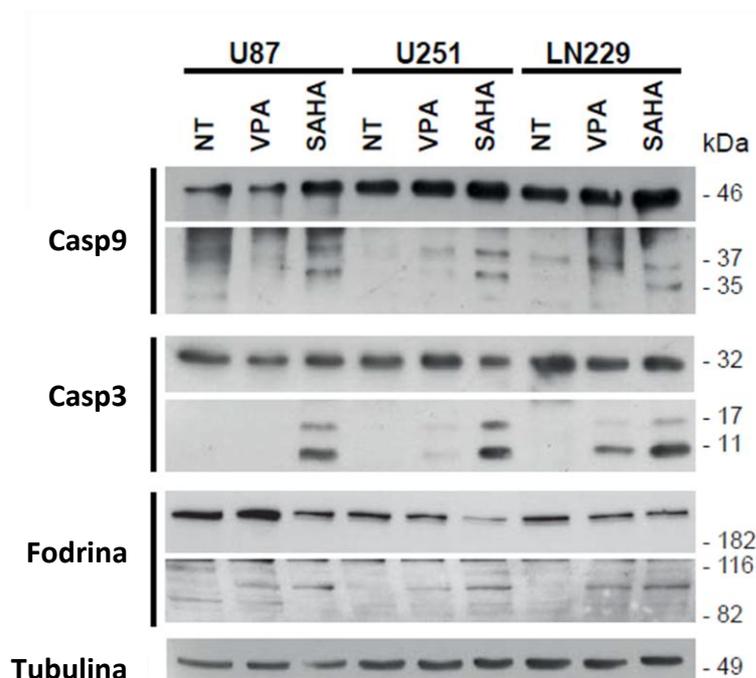


Figura 30. Análisis de la expresión y procesamiento de la caspasa-9, caspasa-3 y fodrina en las tres líneas U87-MG, U251-MG y LN229. Tras 24h de tratamiento con los HDACi, (10mM VPA y 10 μ M SAHA) se puede observar la activación por corte de las caspasas -9 y -3, y el corte del sustrato de caspasa-3, fodrina. NT: no tratado.

Como podemos observar en la figura 30, el tratamiento con 10 μ M SAHA es capaz de promover tanto la formación de los fragmentos de caspasa-9 (37 y 35kDa) como de caspasa-3 (17 y 12 kDa) en las tres líneas de glioma. El tratamiento con 10mM VPA tiene el mismo efecto, aunque con menor potencia, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en viabilidad y clonogenicidad para esta dosis de HDACi. Este

dato se correlaciona con los resultados obtenidos en el ensayo de actividad caspasa-3 (Figura 31), donde vemos que SAHA es capaz de producir su activación de forma significativa. Para completar estos resultados, se analizó el corte de fodrina, que es un sustrato final de las caspasas (Martin *et al.*, 1995), y se puede ver que la activación de las caspasas, produce el corte proteolítico de esta proteína (Figura 30), por lo que, de nuevo nos confirma que los HDACi promueven la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis. Además, la activación de caspasa-3 es bloqueada con la adición del inhibidor, Q-VD-Oph (Figura 31).

Con lo que respecta a la expresión de las procaspasas, no se observan variaciones en los niveles de proteína para caspasa-9 (45kDa) ni para caspasa-3 (35kDa) tras los tratamientos con los inhibidores de las HDAC.

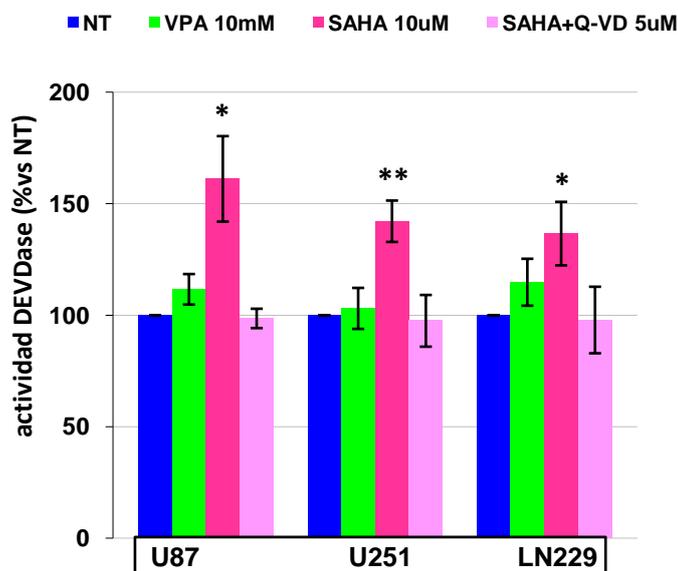


Figura 31. Análisis de la actividad de caspasa-3. Las tres líneas de glioma fueron tratadas con los HDACi (10mM VPA y 10 μ M SAHA) y el inhibidor de caspasas, 5 μ M Q-VD-Oph, durante 24h. Se midió la actividad caspasa con el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC. La lectura se realizó a las 8h del inicio del ensayo. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes. NT: no tratado. Análisis estadístico con el test t-student siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5.1 Estudio de la implicación de las caspasas en la muerte inducida por los tratamientos con los HDACi

Con el fin de determinar si la activación de la vía intrínseca de la apoptosis era necesaria para que los inhibidores de las histona desacetilasas, VPA y SAHA, causaran la muerte de las células de glioma, analizamos la viabilidad celular en presencia de un inhibidor de caspasas de amplio espectro, el Q-VD-OPh.

5.1.1 Ensayo de Viabilidad indirecto con WST-1

Las líneas celulares fueron tratadas durante 48h a una concentración de: 10mM VPA, 10 μ M SAHA y 5 μ M Q-VD-OPh y finalmente se realizó el ensayo de viabilidad con WST-1.

En el gráfico de la figura 32 se puede observar que el inhibidor de caspasas no es capaz de bloquear el efecto de ambos HDACi sobre la viabilidad celular en ninguna de las tres líneas celulares de glioma.

Es importante remarcar que el inhibidor de caspasas a la concentración de 5 μ M no reduce -de forma significativa- la viabilidad de las líneas de glioma utilizadas y, por lo tanto, no parece tener toxicidad a la concentración de uso durante el tiempo de ensayo. De nuevo se observa que 10mM VPA tiene menor efecto que 10 μ M SAHA sobre la viabilidad de las tres líneas celulares de glioma, como se observa en la figura 25.

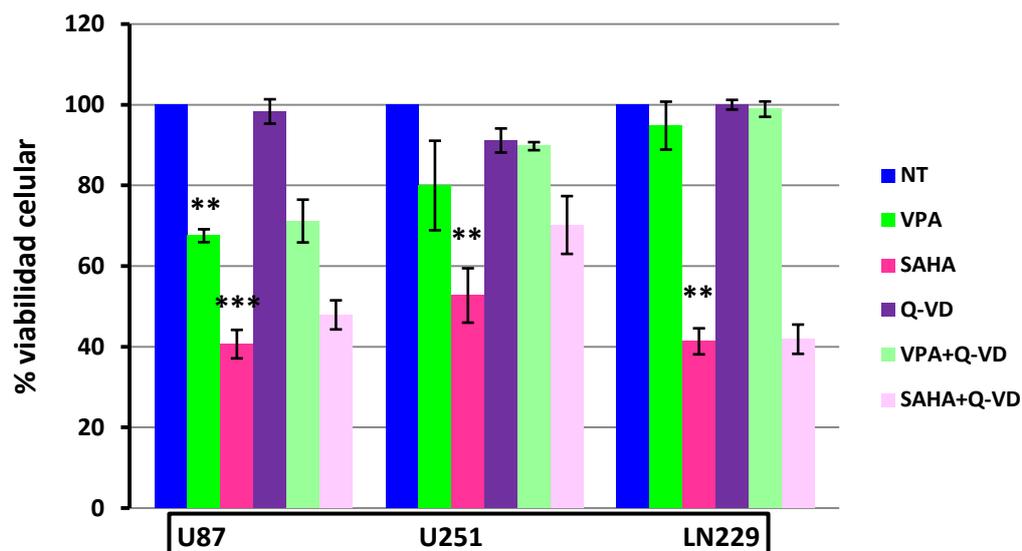


Figura 32. La inhibición de las caspasas no bloquea la muerte inducida por los HDACi en ninguna de las tres líneas de glioma. Resultados de la viabilidad celular de las tres líneas, U87-MG, U251-MG y LN229 después del tratamiento durante 48h con 10mM VPA, 10 μ M SAHA; en presencia o no del inhibidor de caspasas Q-VD-OPh (5 μ M). Los resultados son promedio de 4 ensayos independientes. NT: no tratado. El análisis estadístico se llevó a cabo por el método t-Student comparando los tratamientos con las células no tratadas, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.1.2 Contaje celular directo mediante exclusión con azul de tripano

El experimento descrito anteriormente se repitió para realizar un contaje directo de las células vivas mediante exclusión con azul de tripano, para verificar que los cambios en la viabilidad celular detectados de forma indirecta eran debidos a la inducción de muerte celular y no a cambios en la actividad mitocondrial. Las tres líneas celulares fueron tratadas durante 48h con 10mM VPA y 10 μ M SAHA; el inhibidor de caspasas Q-VD-OPh (5 μ M) y una combinación de los HDACi con el inhibidor de caspasas. Tras la tinción con azul de tripano el contaje celular se realiza en una cámara de Bürker, obteniéndose los resultados representados en la figura 33:

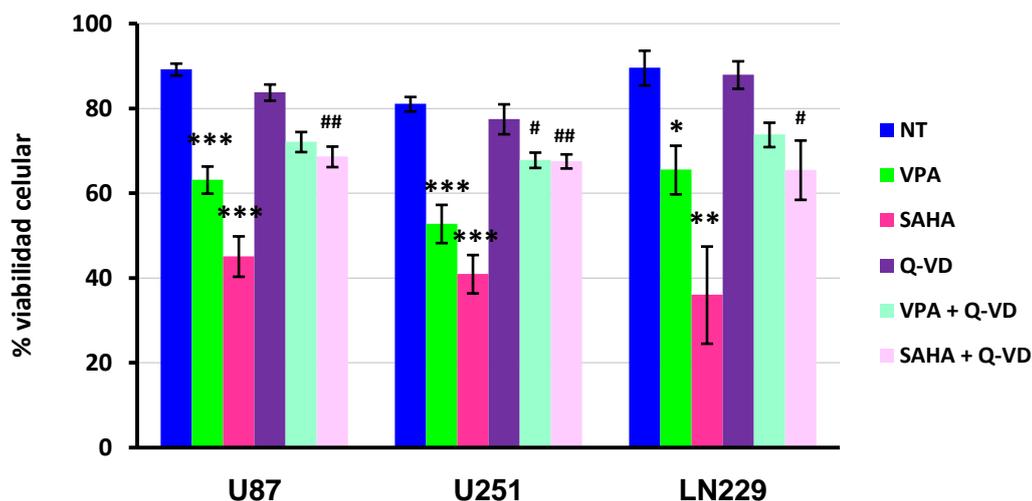


Figura 33. El inhibidor de las caspasas, Q-VD-OPh, revierte parcialmente la toxicidad causada por los HDACi. Las tres líneas de glioma se sometieron durante 48h a los siguientes tratamientos: 10mM VPA, 10 μ M SAHA, 5 μ M Q-VD y combinados, VPA+Q-VD y SAHA+Q-VD. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos independientes. NT: no tratado. El análisis estadístico se llevó a cabo por el método t-Student comparando los tratamientos con las células no tratadas, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, y comparando con los tratamientos individuales con los HDACi, # p <0.05, ## p <0.01

El inhibidor de las HDACs VPA, a la concentración de 10mM, reduce la viabilidad celular a valores similares para las tres líneas estudiadas, entre 35-40%. Sin embargo, la adición del inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh, aunque reduce parcialmente la muerte su efecto sólo es significativo en la línea U251-MG.

SAHA (10 μ M) produce una mayor citotoxicidad en las tres líneas de glioma con una reducción del número de células vivas del 80%. La adición del inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh, reduce significativamente la toxicidad de SAHA en las tres líneas. Este resultado discrepa de lo observado con el ensayo de viabilidad indirecto (Figura 32), en el cual no se observaba una recuperación significativa de la viabilidad al añadir el inhibidor de caspasas. Sin embargo, el conteo directo de las células vivas es un método más robusto y fiable y, por lo tanto, los resultados indican que la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis contribuye a la muerte inducida por los HDACi.

6. Estudio de los efectos de los inhibidores de las HDAC en la integridad del DNA genómico

Una vez se ha determinado que el tratamiento con SAHA hace disminuir la viabilidad de las células en casi un 50% y produce la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, queremos comprobar si esta activación de la cascada de caspasas producida por los HDACi causa fragmentación del DNA. Para ello analizaremos la integridad del DNA mediante la técnica de CHEF-Ladder que te permite visualizar la fragmentación del DNA genómico de alto y bajo peso molecular.

La fragmentación del DNA en escalera o *ladder* es un paso final de la vía apoptótica a través del cual el DNA es cortado en fragmentos internucleosomas de entre 180-200bp. Esto permite observar una distribución característica de los fragmentos del DN en escalera o *ladder* al correr el DNA en un gel de agarosa, demostrando así que la fragmentación es una consecuencia de la activación de la vía clásica de la apoptosis. Además, la fragmentación de alto peso molecular corresponde a cortes entre los diferentes loops de la cromatina empaquetada, equivalentes a un tamaño entre 50-300Kbp, que dependerán de los sitios donde tengan lugar los cortes.

En este experimento las tres líneas celulares fueron tratadas durante 48h con SAHA (10 μ M) con y sin el inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh (5 μ M). Los resultados obtenidos del análisis por CHEF, correspondientes a la fragmentación de alto peso molecular (*high molecular weight fragmentation*, HMWF), y de bajo peso molecular (*low molecular weight fragmentation*, LMWF), se muestran en la siguiente figura 34.

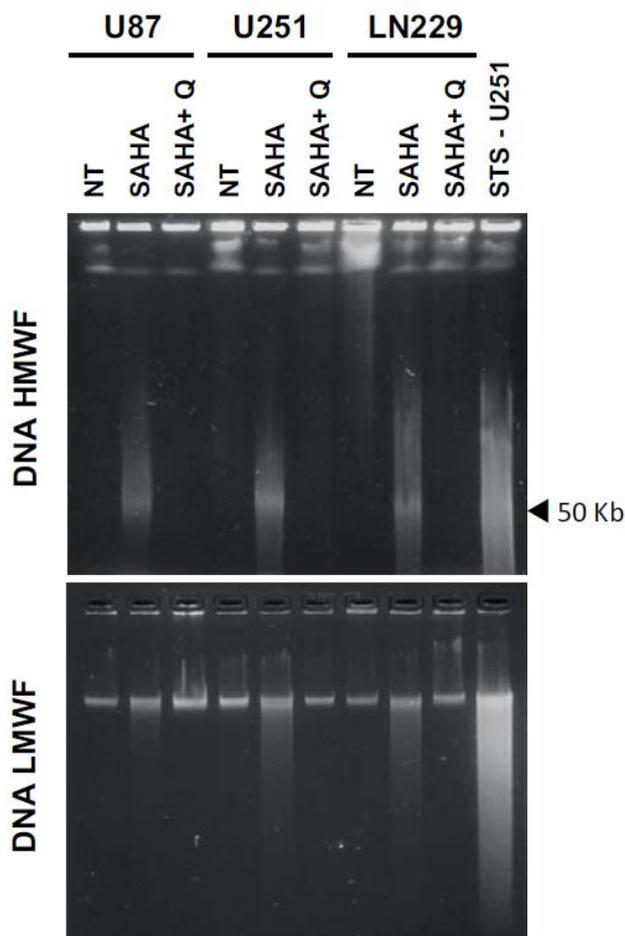


Figura 34. Resultados del análisis de la fragmentación del DNA por la técnica de CHEF-Ladder. Las tres líneas de glioma U87-MG, U251-MG y LN229 fueron tratadas con 10 μ M SAHA con o sin el inhibidor de caspasas, 5 μ M Q-VD-Oph durante 48h. Como control positivo, la línea U251-MG se trató con el inductor de apoptosis, estaurosporina (STS) 1 μ M, 24h. En la parte de arriba de la imagen, se muestra la fragmentación de alto peso molecular (DNA HMWF), mientras que en la parte inferior aparece la fragmentación de bajo peso molecular (DNA LMWF). NT: no tratado.

Los resultados muestran que el tratamiento con SAHA durante 48h causa la formación de fragmentos de DNA de 50Kbp en las tres líneas de glioma; mientras que por lo que se refiere a la fragmentación de bajo peso molecular, no se observa el patrón característico de *ladder* (degradación en escalera) sino que aparece una distribución de los fragmentos en forma difusa o *smear*. Nuestro control positivo son células U251-MG tratadas con estaurosporina (STS). Estas células presentan del mismo modo fragmentos de 50Kbp, mientras que tampoco muestran fragmentación en forma de escalera, como hubiera sido normal al tratarse de un inductor de la apoptosis. Estos resultados indican que estas células cuando mueren por apoptosis no producen fragmentación de bajo peso molecular en escalera.

Además, se observa que el tratamiento de las tres líneas celulares con SAHA combinado con el inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh, hace desaparecer tanto la fragmentación de alto peso molecular como la de bajo peso molecular. Este resultado es interesante ya que, a pesar de que la inhibición de las caspasas no bloquea completamente la muerte inducida por los HDACi, nos está indicando que la activación de las caspasas tiene un papel importante en la degradación final del DNA.

Para profundizar más en el papel que tiene la vía intrínseca de la apoptosis en la degradación del DNA mediada por los inhibidores de las HDAC, el siguiente paso fue sobre-expresar una proteína anti-apoptótica, Bcl-X_L en la línea U251-MG, y comprobar si era capaz de bloquear la fragmentación del DNA. En primer lugar, se transdujeron las células con el lentivirus de sobre-expresión de esta proteína y una vez comprobado, mediante microscopia que las células habían sido transducidas correctamente (el plásmido contiene el cDNA de la proteína fluorescente verde, GFP), éstas se sometieron a tratamientos de 48h con los HDACi, obteniéndose los resultados que se muestran a continuación (Figura 35).

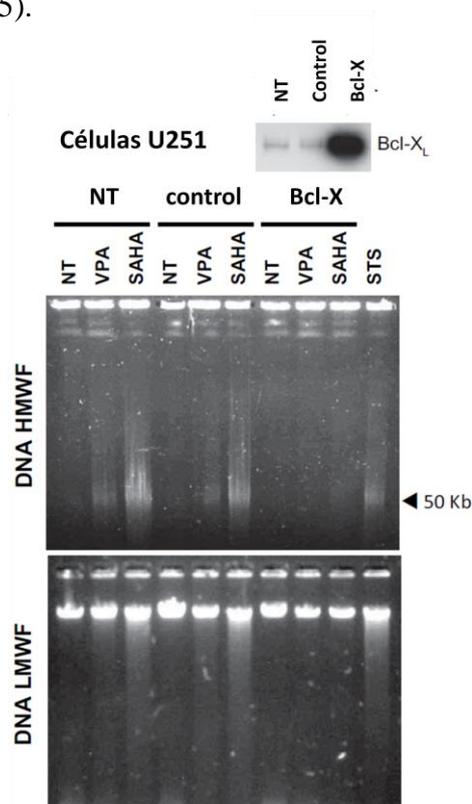


Figura 35. Análisis del efecto de la sobre-expresión de Bcl-X_L en la fragmentación del DNA inducida por los HDACi. Las células de la línea U251-MG se trataron con 10mM VPA ó 10µM SAHA durante 48h. Como control se trató las células con 1µM STS, 24h. Las muestras fueron recogidas para un posterior análisis mediante la técnica CHEF-Ladder de la fragmentación del DNA de alto peso molecular (HMWF) y de bajo peso molecular (LMWF). En la parte superior, aparece la comprobación por Western blot de la expresión de la proteína Bcl-X_L, en condiciones normales y sobre-expesada. NT: no tratado, STS: estaurosporina.

Tal y como se muestra en la parte superior de la imagen, en la línea U251-MG se logró una expresión de la proteína de Bcl-X_L muy por encima de los niveles basales. Una vez comprobado que la transducción había tenido lugar correctamente, se procedió con el análisis de la fragmentación del DNA (HMWF y LMWF). Se puede observar que en células que están sobre-expresando la proteína de Bcl-X_L y están tratadas con los inhibidores de las HDAC (tanto VPA como SAHA), se consigue un bloqueo total de la degradación del DNA. Este resultado sugiere que la vía intrínseca de la apoptosis tiene un papel importante en la fragmentación final del DNA que tiene lugar en la muerte inducida por los HDACi en las células de glioma.

Como ya he mencionado en el apartado de introducción, una de las nucleasas responsables de la degradación del DNA bajo un estímulo de muerte que activa la cascada de las caspasas es CAD (*Caspase-activated DNase*). Nuestro siguiente paso fue analizar si la fragmentación observada tras el tratamiento con SAHA es debida a la activación de esta nucleasa. Para realizar esto, introducimos, mediante vectores lentivirales, dos variantes de shRNA contra el RNA mensajero (mRNA) de CAD en las células de la línea U251-MG (Figura 36A). Una vez transducidas las células, se procedió al tratamiento de 48h con el 10μM SAHA, usando 1μM STS como control positivo.

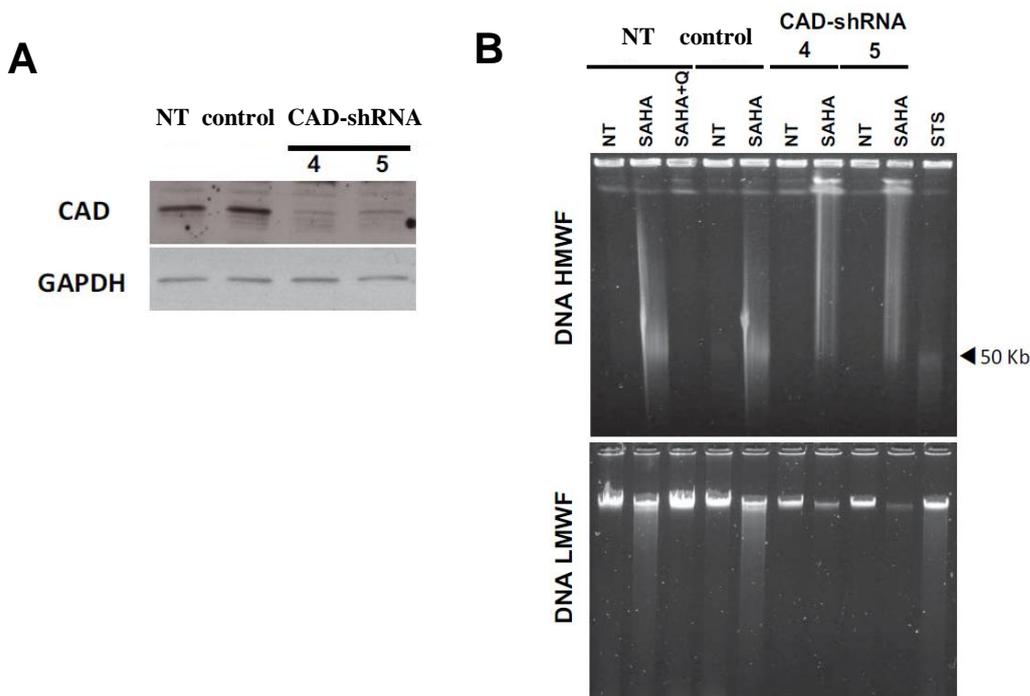


Figura 36. Efecto de la disminución en la expresión de la nucleasa CAD sobre la fragmentación del DNA que induce SAHA. Se usaron dos shRNA específicos contra mRNA de CAD (4 y 5) en células U251-MG que posteriormente, fueron tratadas durante 48h con 10 μ M SAHA. **A)** Comprobación por western blot de la disminución en la expresión de CAD. **B)** Análisis por CHEF-*Ladder* de la fragmentación del DNA tras la disminución de CAD; parte superior de la imagen, HMWF (fragmentación alto peso molecular); y parte inferior, LMWF (fragmentación bajo peso molecular). NT: no tratado, STS: estaurosporina.

En la figura 36B, observamos que cuando disminuimos la expresión de la nucleasa CAD, la fragmentación producida por SAHA, en la cual aparecían fragmentos de 50Kbp, ahora desaparece y tampoco encontramos fragmentación de bajo peso molecular (LMWF). Sin embargo, en la fragmentación de alto peso molecular aparece un patrón de degradación en forma de *smear*, que no había aparecido previamente.

Estos resultados parecen indicar que CAD es una endonucleasa necesaria para la formación de fragmentos de DNA de 50Kbp tras el tratamiento con los HDACi, y además nos sugiere que la aparición de esta HMWF es necesaria para la fragmentación final de bajo peso molecular. Por último, la aparición de un patrón en forma de *smear*, no observado cuando inhibimos las caspasas con el inhibidor Q-VD-OPh (Figura 34) o cuando sobre-expresamos Bcl-X_L (Figura 35) pero que sí aparece cuando estamos disminuyendo la expresión de la nucleasa CAD; nos hace pensar que existe otras nucleasas que son activadas como consecuencia de la activación de las caspasas y que participan en los procesos iniciales de degradación del DNA, produciendo este patrón de degradación de alto peso molecular en *smear*.

7. Determinación del daño al DNA inducido por SAHA y el agente terapéutico Temozolomida (TMZ)

Puesto que se ha descrito que uno de los mecanismos involucrados en la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis es la activación de la respuesta al DNA dañado, nuestro siguiente paso fue caracterizar si los tratamientos con SAHA eran capaces de promover la formación de rotura de doble cadena en el DNA genómico. La rotura de doble cadena del DNA es uno de los daños más severos, los cuales pueden estar inducidos por ciertos fármacos y también por radiación ionizante.

Para este tipo de estudio analizamos de forma directa la presencia de daño en el núcleo mediante la técnica de inmunofluorescencia, detectando así la histona H2AX fosforilada en la Ser139, que recibe el nombre γ H2AX. Esta fosforilación es un marcador de daño al DNA, puesto que en los sitios donde se ha producido rotura de doble cadena del DNA tiene lugar la fosforilación de la H2AX por ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) como mecanismo de marcaje para su reparación.

En este experimento se cuantificó el porcentaje de células que sufren daño al DNA (DSB) y que, por tanto, son positivas para la IF con el anticuerpo anti- γ H2AX después de los diferentes tratamientos. Las tres líneas celulares fueron tratadas durante 48h con los siguientes fármacos: SAHA (10 μ M) y TMZ (100 μ M). Este último se usó como agente inductor directo de daño al DNA. Los resultados se muestran en la figura 37.

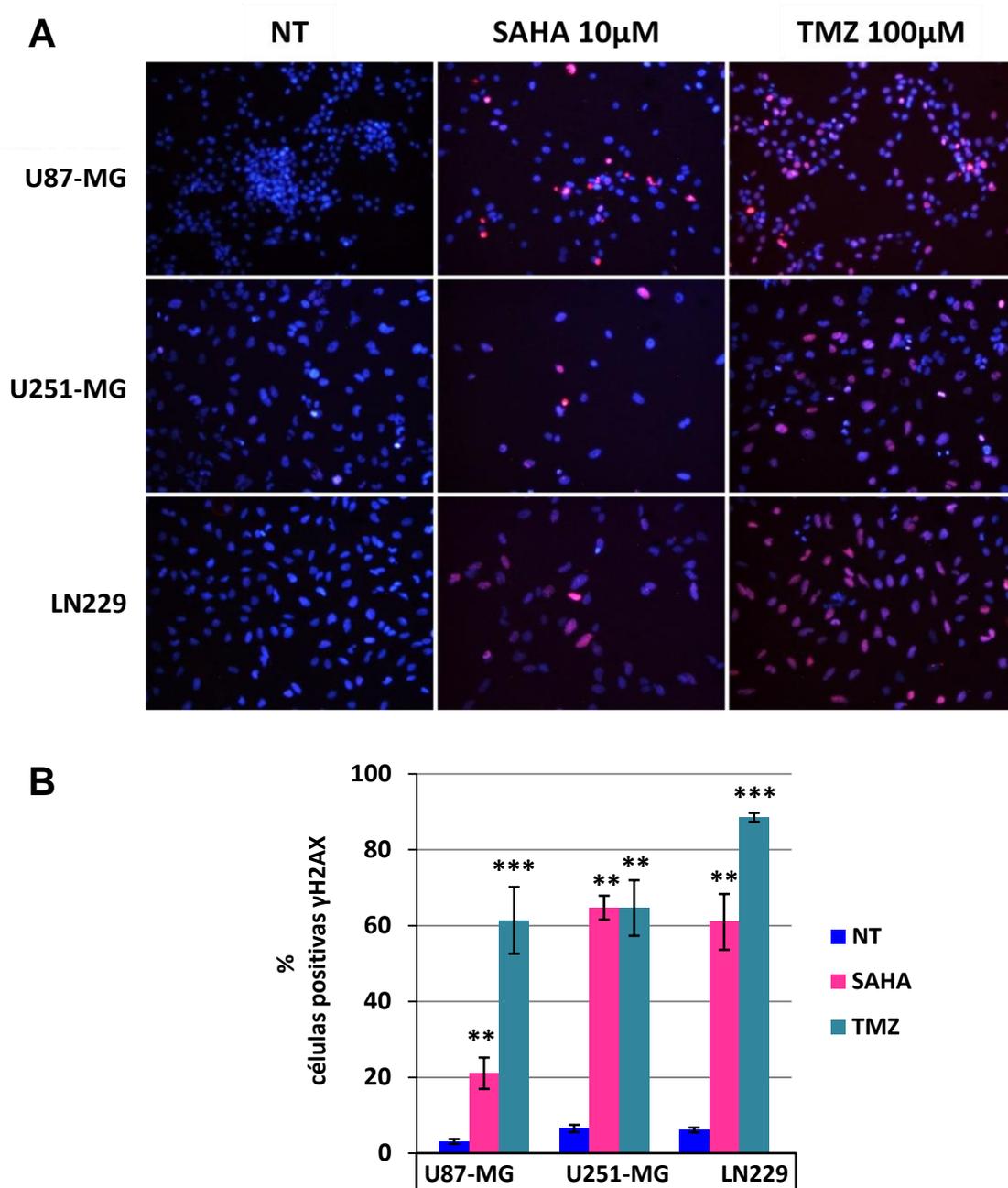


Figura 37. Análisis de la formación de rotura de la doble cadena del DNA mediante la inmunodetección de γ H2AX en células de glioma tratadas durante 48h con 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ. A) Imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia (150X) donde vemos el marcaje de γ H2AX en rojo y los núcleos en azul. B) Contaje de células positivas para γ H2AX con respecto al total de células. NT: no tratado. Análisis estadístico mediante el test t-student, siendo ** $p<0.01$, * $p<0.001$**

Tal y como se observa en el gráfico, SAHA es capaz de inducir rotura de doble cadena en el DNA de forma significativa en las tres líneas celulares de glioma, siendo la U87-MG la línea con menor efecto con un incremento de 7 veces el valor basal. Las

líneas U251-MG y LN229 tienen un incremento en la formación de DSB 10 veces mayor que el basal. Por otro lado y como era de esperar, TMZ produce un mayor daño al DNA que SAHA, causando un incremento entre 10-20 veces el valor basal. La línea es la que presenta un porcentaje mayor de daño al DNA siendo de casi el 90% del total de las células.

Debido a que en estos experimentos, se observó que el tratamiento con TMZ era más eficiente en promover daño al DNA, nuestro siguiente paso fue comprobar la sensibilidad de las tres líneas de glioma a concentraciones crecientes de esta droga (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M y 500 μ M). Las células se trataron durante 48h y pasado ese tiempo se realizó el ensayo de viabilidad basado en la degradación de las sales WST-1 (Figura 38).

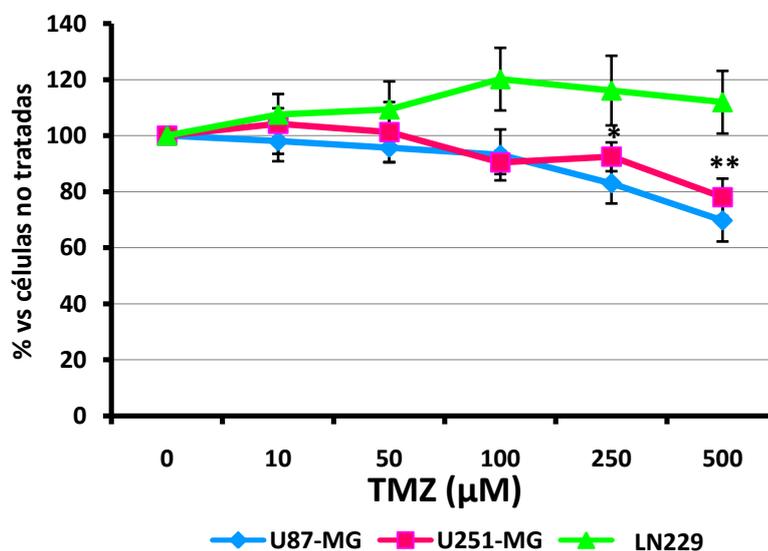


Figura 38. Dosis-Respuesta de las tres líneas de glioma al tratamiento con TMZ. Respuesta de las tres líneas celulares U87-MG, U251-MG y LN229 a diferentes concentraciones de TMZ durante 48h y análisis de la viabilidad celular con el reactivo WST-1. Se muestra la media de resultados independientes de 4 experimentos. Análisis estadístico mediante el test t-student, siendo *p<0.05, **p<0.01

En la figura anterior podemos observar que el comportamiento de las líneas al tratamiento con TMZ es muy diferente al observado para los dos HDACi, VPA y SAHA (Figura 25). La línea LN229 es la línea más resistente, ya que la viabilidad celular no disminuye en prácticamente ninguna de las concentraciones testadas, a pesar de ser la línea que presenta mayor daño en el DNA. Por otro lado, las células U87-MG y

U251-MG sólo se ven afectadas a dosis elevadas (250-500 μ M) de la droga, alcanzando una viabilidad del 70 y 80% respectivamente, a la concentración más elevada de TMZ.

La concentración de TMZ utilizada habitualmente en referencias bibliográficas en la realización de experimentos *in vitro* es 100 μ M, sin embargo observamos que a esta concentración este fármaco afecta muy poco a la viabilidad de las células de glioma, lo cual sugiere que presentan una mayor resistencia a TMZ que a los HDACi, a pesar de producir un mayor daño al DNA.

7.1 Implicación de las caspasas y la vía intrínseca de la apoptosis en la formación de DSB

Una vez determinado que el inhibidor de las HDAC, SAHA, es capaz de promover daño mediante la rotura de la doble cadena del DNA, nuestro siguiente objetivo fue analizar si este daño producido por SAHA era dependiente de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis y por consiguiente de la activación de las caspasas. Primero, añadimos a las tres líneas de glioma un inhibidor universal de las caspasas, Q-VD-OPh, con el fin de determinar si tenía algún efecto en la formación de DSB en el DNA. Para este experimento se realizaron los mismos tratamientos que en el apartado anterior, pero esta vez añadiendo el inhibidor de caspasas, a una concentración de 5 μ M, en combinación o no con el tratamiento farmacológico, 10 μ M SAHA durante 48h.

En segundo lugar, se transdujeron células U251-MG con el gen *Bcl-X* para determinar la implicación de la vía intrínseca de la apoptosis en la formación de DSB. Una vez transfectadas, las células fueron tratadas durante 48h con 10 μ M SAHA.

En ambos experimentos, pasado el tiempo de tratamiento se procedió a realizar la inmunofluorescencia contra la proteína fosforilada H2AX. El contaje de las células positivas para γ H2AX con respecto al total de la población celular se representa en la figura 39.

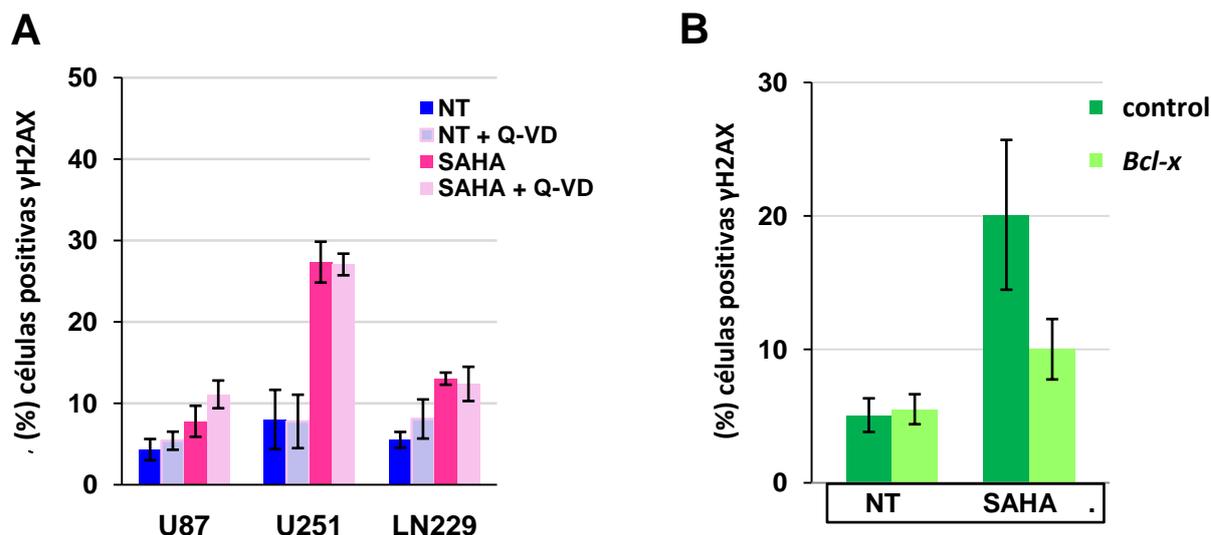


Figura 39. Implicación de las caspasas y la vía intrínseca en la formación de DSB. En el gráfico se detalla el porcentaje de la población celular que contiene la histona H2AX fosforilada, que es un indicador de la presencia de DSB en el DNA. **A)** Se representan las tres líneas, U87-MG, U251-MG y LN229 con el tratamiento farmacológico 10μM SAHA con o sin el inhibidor de caspasas Q-VD-Oph (5μM). **B)** Células U251-MG sobre-expresando el gen *Bcl-X* y tratadas con SAHA durante 48h. Estos resultados son el promedio de 4 experimentos independientes. NT: no tratado. El análisis estadístico mediante el t-student.

Como se muestra en la imagen, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos en los que se ha añadido el inhibidor de caspasas Q-VD-Oph y los que no tienen el inhibidor de caspasas, en ninguna de las tres líneas de glioma. La sobre-expresión de *Bcl-X_L* reduce el daño al DNA pero debido a la gran variabilidad de los experimentos, no llegamos a observar diferencias significativas (Figura 39B). Por lo tanto, nuestros resultados descartan el papel de las caspasas en la formación de DSB en el DNA, pero se deberían de realizar más estudios para determinar la implicación de otras proteínas mitocondriales que pudiesen ser liberadas con la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en este efecto de SAHA.

7.2 Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en la producción de daño al DNA inducido por los HDACi

Se ha descrito que los inhibidores de las HDAC pueden inducir un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, relacionándose este aumento con el daño al DNA. Debido a que en nuestros resultados anteriores hemos observado que SAHA produce daño en el DNA y que este daño no es revertido con la adición de un

inhibidor de caspasas (Q-VD-OPh), nuestro siguiente objetivo era analizar: primero si el tratamiento con los HDACi producía un incremento en la producción de ROS; y segundo, en caso de que esto fuera cierto, determinar si este aumento de ROS contribuye o tiene un papel en la producción de DSB en el DNA genómico que observamos en las líneas de glioma tratadas con los HDACi.

En primer lugar, se analizó la producción de ROS tras los tratamientos de 24h con los HDACi, 10mM VPA y 10 μ M SAHA mediante citometría de flujo (Figura 40).

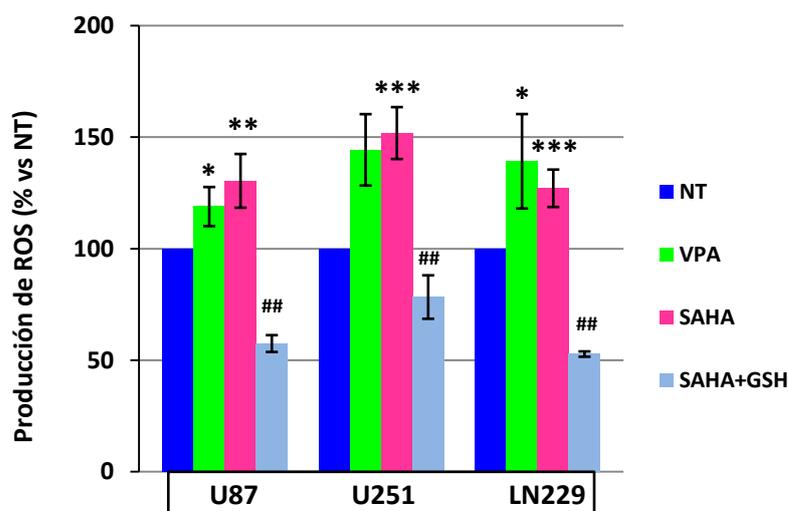


Figura 40. Producción de ROS en las tres líneas de glioma tras el tratamiento con los HDACi y su bloqueo con glutatión. Las células se trataron 24h con 10mM VPA, 10 μ M SAHA y SAHA en combinación con el agente reductor, 10mM glutatión (GSH). Estos resultados son el promedio de 4 experimentos independientes.. El análisis estadístico se llevó a cabo por el método t-Student comparando los tratamientos con las células no tratadas (NT), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, o con respecto a SAHA, ## $p < 0.01$

Ambos HDACi producen un incremento en la producción de ROS, siendo mayor el incremento obtenido con SAHA en las líneas U87-MG y U251-MG. También observamos que la línea U251-MG es la línea en la cual, tanto VPA como SAHA, producen un incremento superior en comparación con las líneas U87-MG y LN229. La adición de glutatión 10mM (GSH) es capaz de bloquear la producción de ROS en las tres líneas de glioma, cuando se añade en combinación con SAHA, por debajo de los niveles basales.

Para completar estos resultados, y puesto que la oxidación proteica está relacionada con un incremento en los niveles de carbonilación de proteínas, quisimos

detectar el nivel de proteínas carboniladas que teníamos en cada lisado celular después de haber tratado 24h las células con ambos HDACi, VPA y SAHA (Figura 41).

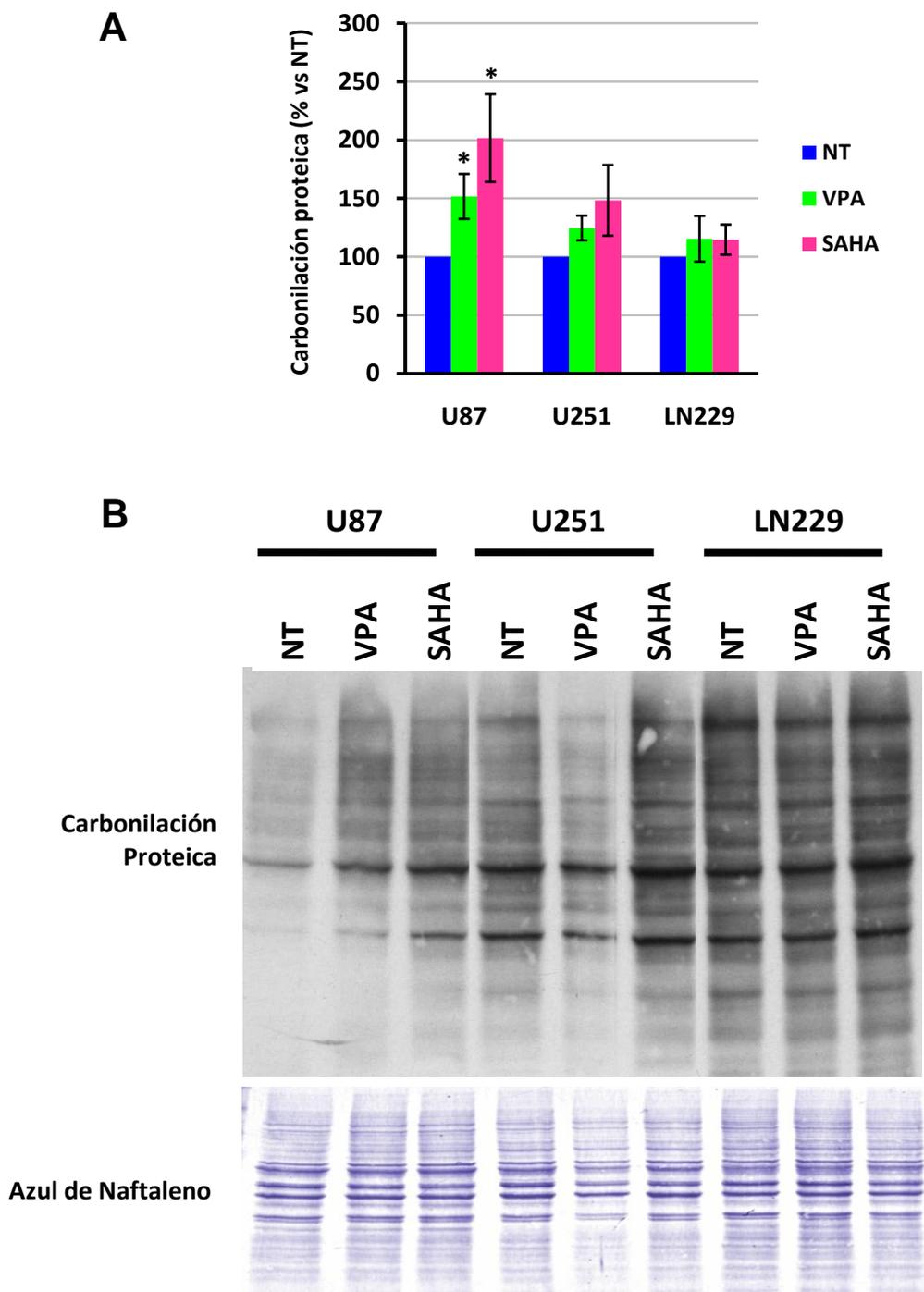


Figura 41. Cuantificación de las proteínas carboniladas en las tres líneas de glioma tras los tratamientos de 24h con 10mM VPA y 10µM SAHA. A) Cuantificación de la intensidad de las bandas del western blot, con el promedio de 4 réplicas independientes. **B)** Aparecen los carriles con las diferentes condiciones de tratamiento donde se aprecia la variación entre muestras según la intensidad del carril. Se utilizó un anticuerpo primario contra anti- α -dinitrofenil, como marcador de proteínas carboniladas en un extracto celular. NT: no tratado. Análisis estadístico mediante t-student, siendo $*p < 0.05$

En la imagen superior (Figura 41A) hemos analizado y representado la cuantificación de la intensidad de los carriles obtenidos de cuatro experimentos como el de la imagen inferior (Figura 41B), donde observamos el blot entero en el cual hemos utilizado un anticuerpo primario anti- α -dinitrofenil (DNP) como marcador de proteínas carboniladas. Como se puede ver ambos HDACi producen un incremento en la carbonilación proteica, en la línea U87-MG, mientras que en las líneas U251-MG y LN229 los cambios observados son menores. Por lo tanto, a pesar de incrementar la producción de ROS en todas las líneas cuando se tratan con los HDACi, sólo detectamos un claro incremento en la carbonilación de proteínas en la línea U87-MG, debido posiblemente a que los incrementos de ROS son moderados.

En los últimos años, se ha propuesto que los inhibidores de las HDAC, entre otros SAHA, y otros agentes anti-cancerígenos son citotóxicos para las células tumorales, y no para las células normales, debido a que provocan un incremento en la producción de ROS. El mecanismo que se ha visto implicado es el aumento en la expresión de la proteína de unión a tioredoxina (*thioredoxin-binding-protein-2*, TBP-2) y la disminución en los niveles de expresión de la tioredoxina (*thioredoxin*, TRX) (Marks, 2009). Es por ello que nuestro siguiente paso fue analizar la expresión de ambas proteínas tras los tratamientos de 24h con ambos HDACi y TMZ (Figura 42) para comprobar si realmente el aumento que observamos en los niveles de ROS puede ser consecuencia de una expresión alterada en estas proteínas.

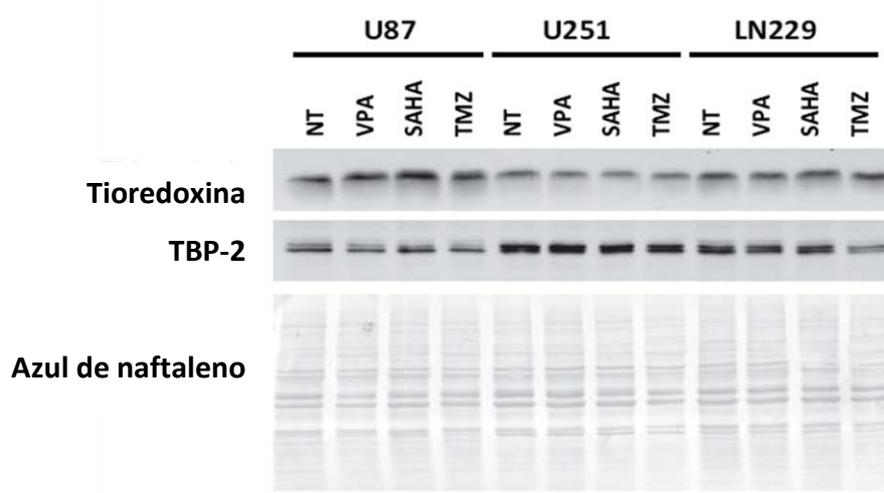


Figura 42. Análisis del efecto de los HDACi en la expresión de Tioredoxina-1 (TRX-1) y la proteína de unión a Tioredoxina (TBP-2) en las células de glioma. Después del tratamiento de 24h con 10mM VPA, 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ, las células fueron lisadas y analizadas mediante la técnica de western blot, usando anticuerpos específicos contra TRX-1 y TBP-2. La carga se verificó mediante la tinción de la membrana con azul de naftaleno. NT: no tratado.

Tal y como se observa en la imagen anterior, en ninguna de las tres líneas observamos variaciones en la expresión de ninguna de las dos proteínas, ni de TBP-2 ni de TRX-1, tras los tratamientos con los inhibidores de las HDAC y TMZ. Por lo tanto, no podemos atribuir el incremento en la producción de ROS a efectos sobre la expresión de estas proteínas.

Con el propósito de determinar si la producción de ROS que hemos observado previamente está involucrada en el daño al DNA inducido en las líneas de glioma por los HDACi, comprobamos si protegiendo a las células de la producción de ROS podemos bloquear la aparición de daño al DNA (células positivas para γ H2AX) observado en resultados anteriores (Figura 37).

Para realizar este experimento, utilizamos dos agentes que reducen el estado oxidativo de las células: 10mM GSH y 15mM NAC. Las tres líneas de glioma, U87-MG, U251-MG y LN229, fueron tratadas durante 48h con: 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ, tanto individualmente como en combinación con ambos agentes reductores. Como control positivo utilizamos la menadiona (100 μ M) que produce daño al DNA mediante un fuerte incremento en la generación de ROS, el cual es totalmente bloqueado por los agentes reductores utilizados (resultados no mostrados en la imagen).

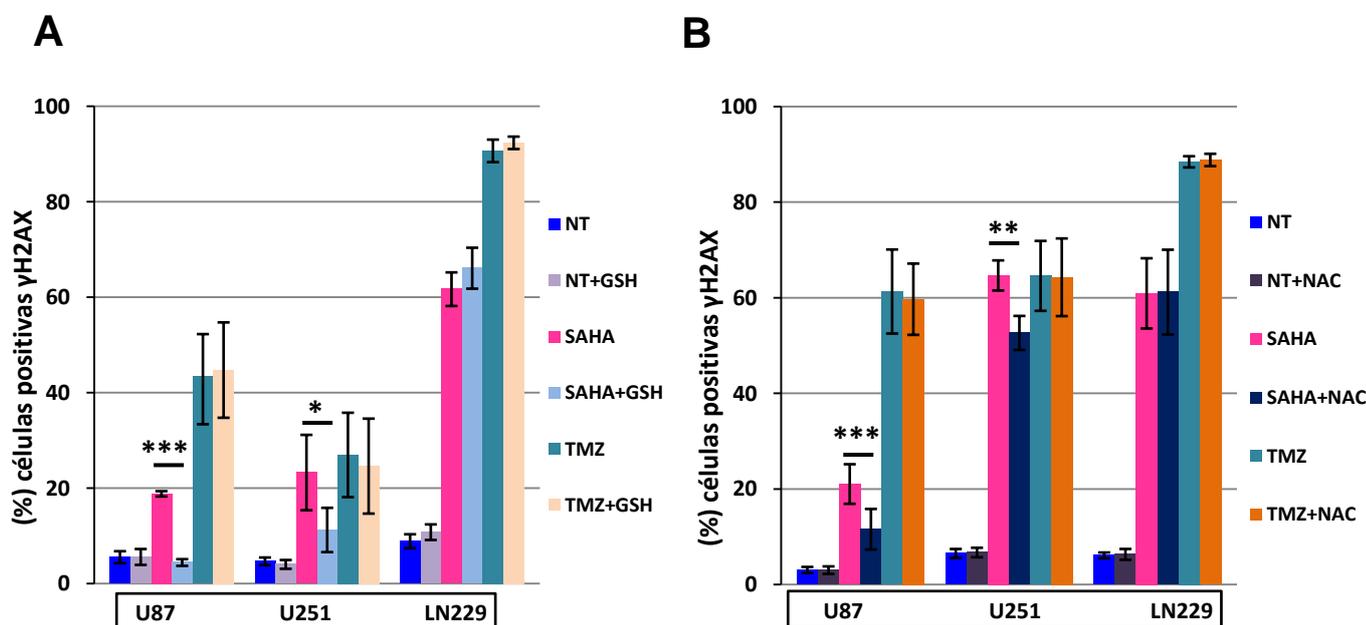


Figura 43. Análisis de los núcleos positivos para γ H2AX en células tratadas con 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ en combinación o no con los agentes reductores. A) El agente reductor utilizado es el GSH 10mM, en combinación o no con SAHA o TMZ, durante 48h. B) En este caso, el agente utilizado para bloquear la producción de ROS es la NAC 15mM en combinación o no con SAHA o TMZ. Los resultados muestran el promedio de 3 y 5 experimentos independientes, respectivamente. NT: no tratado. Análisis estadístico mediante el test t-student, siendo * $<p$ 0.05, ** $<p$ 0.01, * $<p$ 0.001**

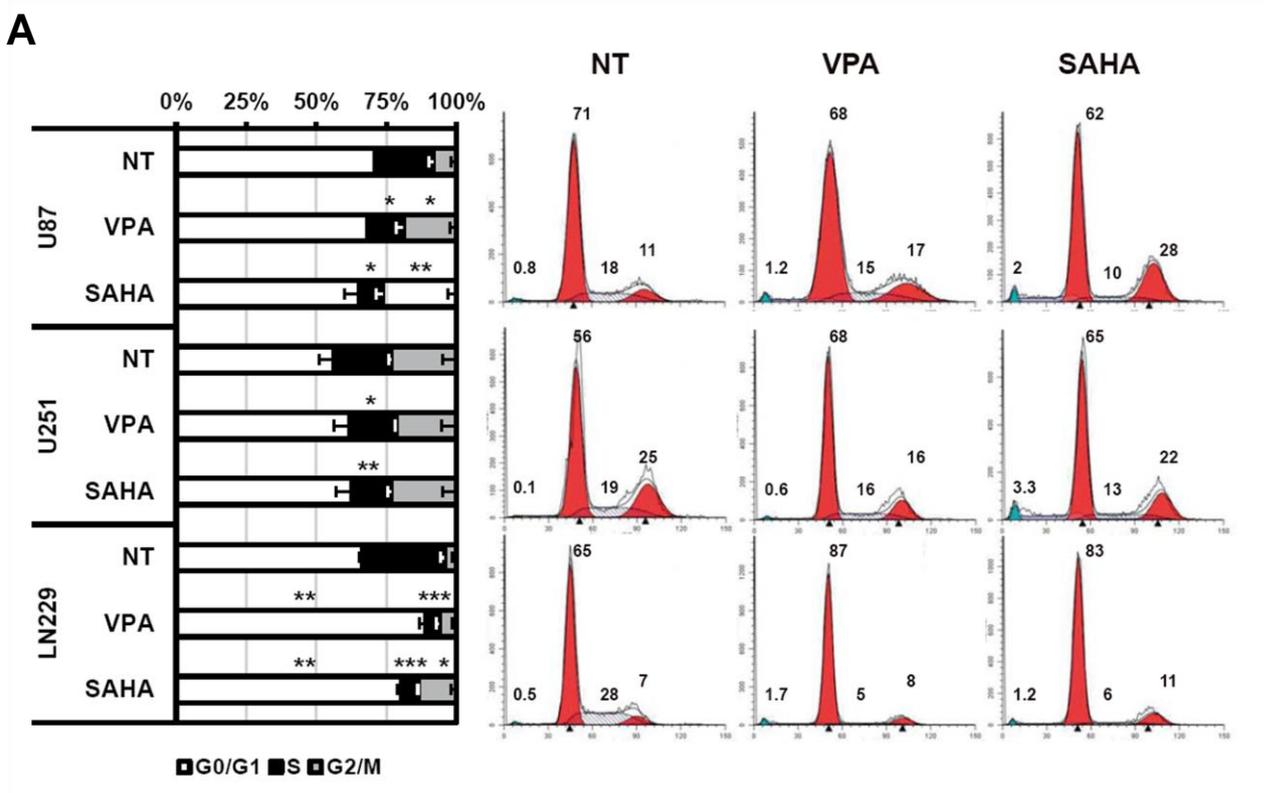
En la figura 43A, observamos que en la línea U87-MG la combinación de GSH con SAHA produce una disminución significativa de las células positivas para γ H2AX, reduciéndose hasta niveles basales. En el caso de la línea U251-MG esta reducción es de aproximadamente un 50% y, por último, en la línea LN229 no encontramos variaciones entre el tratamiento único con SAHA y la combinación con GSH. Como era de esperar, la adición de GSH no afecta el número de células positivas para γ H2AX tras el tratamiento con TMZ.

Por otro lado, con la adición de NAC obtenemos resultados similares (Figura 43B). En la línea LN229 la combinación de SAHA con NAC no produce variaciones en la formación de DSB, pero en las otras dos líneas, U87-MG y U251-MG, NAC es capaz de bloquear parcialmente la formación de DSB inducidos por SAHA en el DNA, de aproximadamente un 50% y 15%, respectivamente, no alcanzando en ninguno de los dos casos los niveles basales. Del mismo modo, el tratamiento con NAC no bloquea la producción de DSB en el DNA en células tratadas con TMZ. Estos resultados indican que la formación de DSB en el DNA inducida por SAHA es debida parcialmente a ROS en las células de glioma U87-MG y U251-MG, y puesto que la reducción no es total y las células LN229 no se ven alteradas con la adición de ninguno de los dos agentes reductores, la producción de ROS no es el único factor que causa finalmente la formación de DSB en el DNA.

8. Análisis de la progresión del ciclo celular tras los tratamientos con los inhibidores de las HDAC

Para profundizar más en la respuesta de las células de glioma al tratamiento con los HDACi, VPA y SAHA, analizamos la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo en las líneas de estudio.

Las células de glioma, U87-MG, U251-MG y LN229, se trataron con los HDACi a las concentraciones ya determinadas, durante 24h. Pasado este tiempo, las células se fijaron y tiñeron con yoduro de propidio para analizarlas por el citómetro de flujo (Figura 44).



B

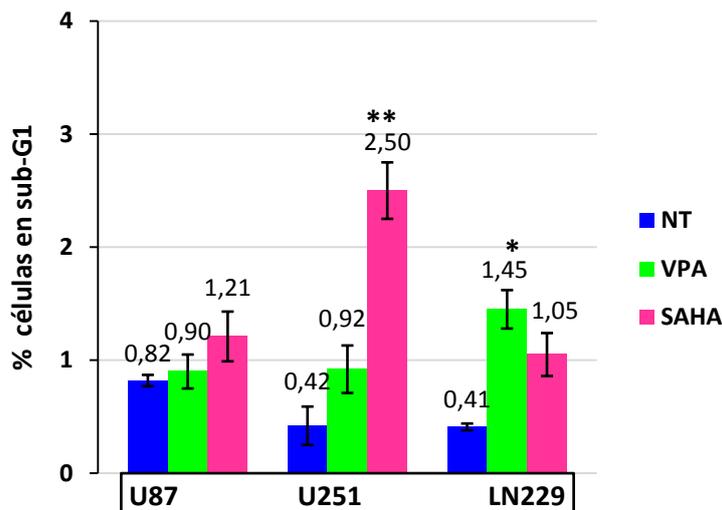


Figura 44. Distribución del ciclo celular tras el tratamiento con los HDACi. A) Análisis por citometría de flujo de las células tratadas con 10mM VPA y 10 μ M SAHA y células no tratadas (NT), durante 24h. Las barras de errores muestran el promedio del porcentaje de células en fase G0/G1, S y G2/M de tres experimentos independientes. Las gráficas de la derecha son resultados representativos de un experimento. B) En el gráfico se representa el porcentaje de células que se encuentran en sub-G1 después de 24h de tratamiento. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Análisis estadístico llevado a cabo mediante el test t-student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En la figura 44A, podemos observar que los tratamientos de 24h con los HDACi son capaces de promover una disminución significativa de las células que se encuentran en fase S, mientras que el incremento en el porcentaje de células en fase G2/M se observa únicamente en las líneas U87-MG y LN229. Además la línea LN229 muestra un aumento significativo de células que se encuentran en la fase G0/G1.

Por otro lado, en la figura 44B, encontramos un dato interesante y es que el pico sub-G1 se encuentra incrementado en las tres líneas de glioma, siendo mayor en la línea U251-MG. Este pico es mucho mayor tras 48h de tratamiento con los HDACi (resultados no mostrados), indicando que ambas drogas promueven la muerte de las células de glioma. Analizamos después si la muerte inducida por SAHA en las células de glioma era apoptosis mediante la doble tinción con AnexinaV- Yoduro de propidio (PI). Los resultados muestran que SAHA es capaz de inducir un incremento significativo en las células positivas para AnexinaV (Figura 45A) en la población negativa para PI (Figura 45B), mientras que no se observan diferencias significativas en la población de células positivas para PI. Estos resultados demuestran que el tratamiento con SAHA de las células de glioma promueve la inducción de la apoptosis.

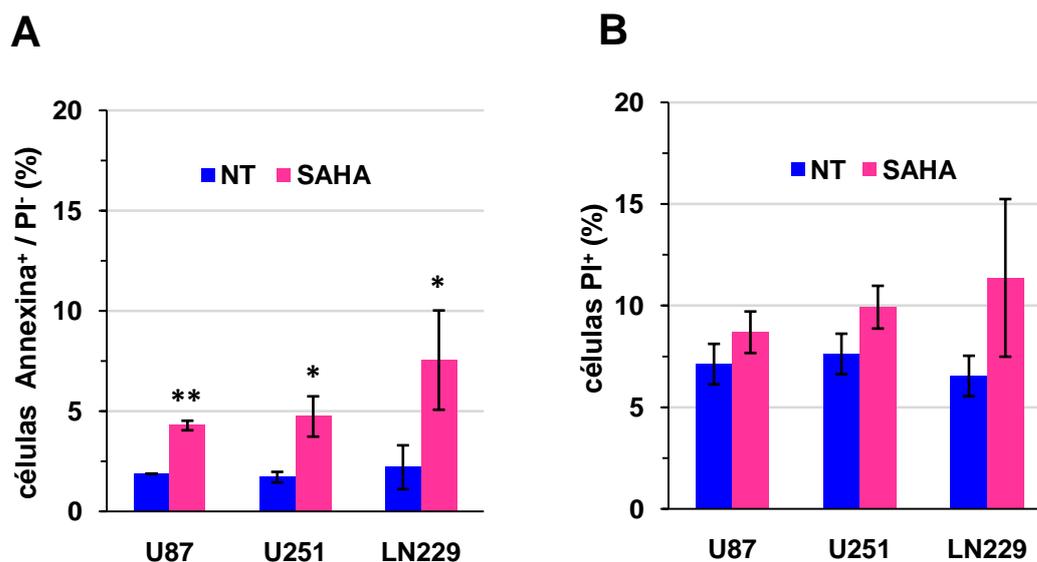


Figura 45. SAHA promueve la inducción de la apoptosis en las células de glioma. **A)** Porcentaje de células apoptóticas (AnexinaV positiva y yoduro de propidio -PI negativa). **B)** Células muertas (positivas para PI). Los resultados muestran el promedio de cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test t-Student (* $p < .05$, ** $p < .01$). NT: no tratado.

8.1 Expresión de proteínas quinasas involucradas en el punto de control G2 del ciclo celular

Debido a las alteraciones observadas en la fase G2/M del ciclo celular decidimos analizar la expresión de proteínas quinasas que tienen un papel importante en el punto de control G2 como son: Chk1 y Wee1.

Chk1 (también conocida como CHEK1) es una quinasa efectora del punto de control G2 en respuesta al daño al DNA. Esta quinasa tiene por tanto un papel importante en ambos puntos de control S y G2, así como también en el desarrollo embrionógico y en la supresión de tumores. Chk1 fosforila cdc25, una importante fosfatasa del ciclo celular, concretamente en la entrada a mitosis, así como también se encarga de fosforilar y activar a Wee1. La proteína quinasa Wee1 actúa como regulador negativo de la entrada en mitosis en la etapa de transición G2/M, fosforilando específicamente y a la vez inactivando el complejo ciclinaB1/cdc2. La fosforilación ocurre exclusivamente en la tirosina-15 (Y15) de cdc2.

Es por ello que nuestro siguiente objetivo fue analizar los niveles de expresión de Chk1 y Wee1, así como también la fosforilación de su sustrato cdc2 (también

conocida como cdk1) después de los tratamientos de 24h con los inhibidores farmacológicos: 10mM VPA, 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ. Los resultados obtenidos mediante análisis por Western Blot y RT-PCR cuantitativa se presentan en la figura 46:

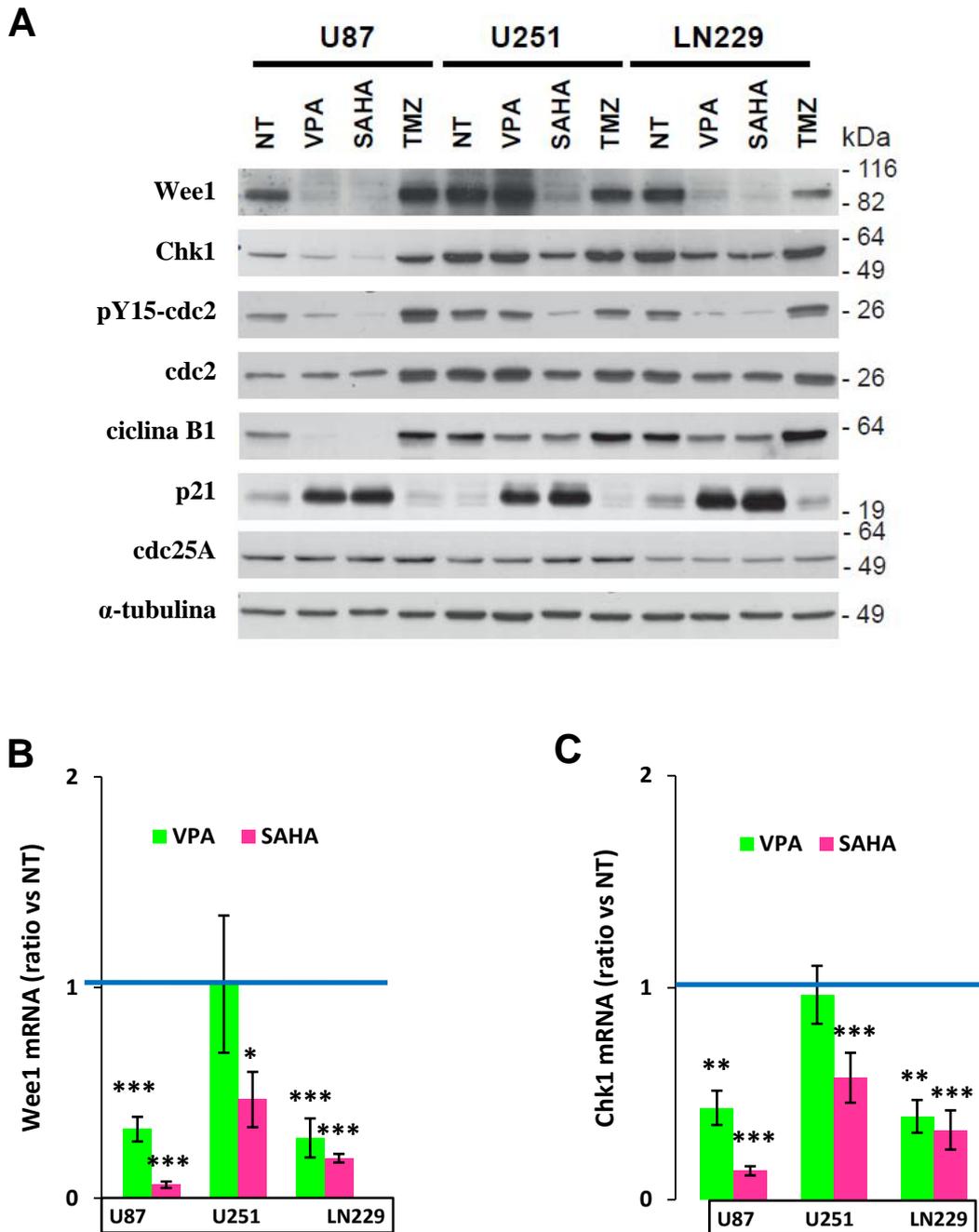


Figura 46. Expresión de las quinasas reguladoras del punto de control G2: Chk1 y Wee1 en células de glioma tratadas 24h con los HDACi (10mM VPA y 10 μ M SAHA) y TMZ (100 μ M). **A)** Las muestras se analizaron por electroforesis-western blot utilizando anticuerpos contra Wee1, Chk1, cdc2 y cdc2-pY15. También se analizaron reguladores del ciclo celular: ciclina B1, p21 y cdc25a. **B)** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa del mRNA de Wee1. **C)** Resultados de la RT-PCR cuantitativa para detectar el mRNA de Chk1. NT: no tratado. Los resultados muestran el promedio de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico mediante el test t-student, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Los resultados de la figura 46A muestran que las tres líneas de glioma expresan tanto Wee1 como Chk1 y que la intensidad de la banda disminuye considerablemente con los tratamientos con VPA y SAHA. La reducción es mayor en el caso del inhibidor SAHA, ya que la expresión disminuye casi hasta desaparecer en las líneas U87-MG y LN229. En el caso del tratamiento con TMZ no se observa disminución en la intensidad de las bandas en ninguna de las líneas, manteniéndose los niveles basales. Los resultados obtenidos en el blot de Wee1 se correlacionan directamente con el estado de fosforilación de cdc2 en Tyr-15 como era de esperar puesto que es el sustrato de fosforilación de Wee1. La expresión de cdc2 también se ve afectada por el tratamiento con los HDACi, aunque la disminución es menos marcada que en el caso de Wee1. Es interesante mencionar que la línea U251-MG es la que muestra mayores niveles de proteína Wee1 seguida de las líneas LN229 y U87-MG. Chk1 también se expresa más en las líneas U251-MG y LN229 que en la línea U87-MG.

Con respecto a los niveles del mRNA, los datos se correlacionan con los obtenidos por western blot, observándose disminución del mRNA tanto de Wee1 (Figura 46B) como de Chk1 (Figura 46C) cuando las células se tratan con los HDACi. Del mismo modo, la disminución es mayor con el tratamiento de SAHA, así como también observamos que el tratamiento con VPA en la línea U251-MG no altera los niveles del mRNA de la misma forma que tampoco variaba la intensidad de las bandas de proteína en el western blot.

Como la expresión de cdc2 no se ve afectada por los HDACi, pero la fosforilación inhibitoria en la Tyr-15 disminuye, analizamos a continuación la expresión de la subunidad reguladora, ciclina B1 (Figura 46A). Se observa que la expresión de ciclina B1 disminuye tras el tratamiento con los HDACi y la expresión del inhibidor del ciclo celular p21 aumenta fuertemente de acuerdo con lo descrito anteriormente (Mateen *et al.*, 2012). Por el contrario, la expresión de cdc25a, fosfatasa involucrada en la regulación de los puntos de control G1/S y G2/M (Shen and Huang, 2012), no se ve afectada. Sin embargo, cdc25a es regulada post-transcripcionalmente, por lo que, sería necesario más estudios que permitiesen una caracterización más detallada de los reguladores del ciclo celular para confirmar si realmente el tratamiento con los HDACi produce parada del ciclo celular G1/S en las células de glioma. Estos resultados indican que los HDACi afectan a la expresión de las quinasas reguladoras de la transición G2/M, Wee1 y Chk1, sugiriendo que las células no van a poder controlar la entrada en mitosis de células con el DNA dañado.

8.1.1 Papel de la endonucleasa Mus81

La endonucleasa Mus81 se activa cuando hay daño al DNA por luz ultravioleta (UV) y también se activa cuando se produce un colapso en las horquillas de replicación. Forma DSB en la horquilla para estimular la reparación mediante la recombinación homóloga permitiendo así que la replicación pueda continuar. Además está relacionada con Chk1 y Chk2 y también se ha visto que se activa cuando hay una disminución de la expresión de Wee1. La falta de Wee1 no sólo induce la fosforilación de H2AX, sino que también promueve una respuesta general al DNA dañado (DDR) y causa un bloqueo en la replicación del DNA. En concreto, la DDR inducida por la eliminación de Wee1 y la formación de DSB dependen de forma crítica del complejo endonucleasa Mus81-Eme1 (Forment *et al.*, 2011). Es por ello que decidimos analizar si Mus81 estaba implicada en el daño al DNA inducido por los inhibidores de las HDAC.

Los resultados de la figura 47A muestran que Mus81 se expresa en las tres líneas de glioma, siendo los niveles basales mayores en la línea LN229, seguida de las líneas U251-MG y U87-MG. Se observa que el tratamiento con los HDACi y TMZ no altera la expresión de Mus81. A continuación, comprobamos la implicación de Mus81 en el daño al DNA mediante la disminución de la expresión de Mus81 con dos shRNA (Figura 47B). Analizamos la formación de DSB y la fragmentación del DNA en la línea U251-MG transducida con los dos shRNA de Mus81. En la parte inferior izquierda de la figura 47B, vemos que la disminución de esta nucleasa no bloquea la formación de DSB tras el tratamiento de 48h con 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ. Del mismo modo, en el panel derecho de la figura 47B, observamos que la disminución de Mus81 no afecta los niveles de fragmentación del DNA de alto peso molecular ni de bajo peso molecular. Esto parece indicar que Mus81 no es la endonucleasa causante del daño al DNA que observamos cuando tratamos las células de glioma con SAHA.

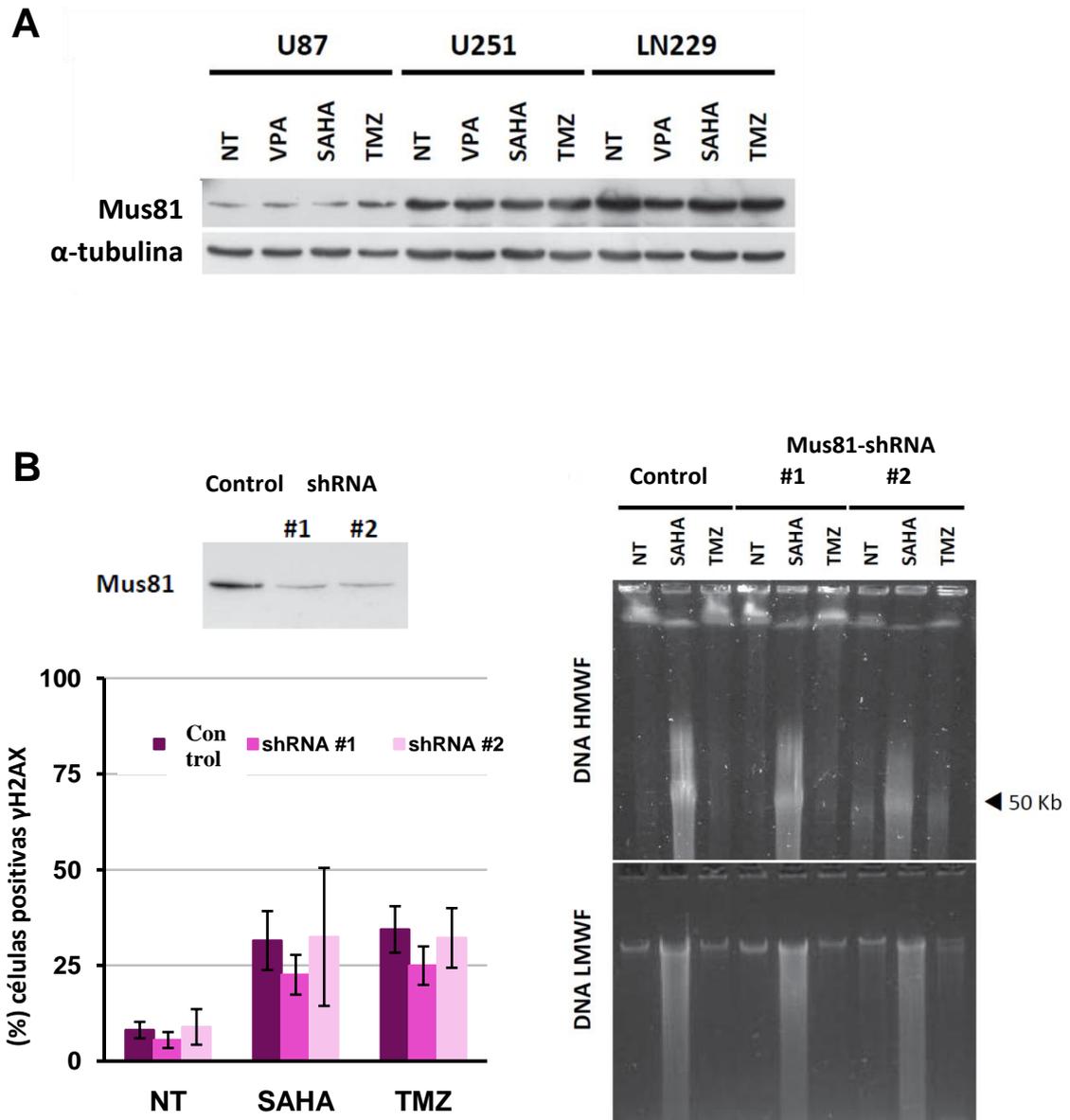


Figura 47. Expresión de Mus81 en células tratadas con HDACi y TMZ y estudio de su implicación en la formación de DSB y fragmentación del DNA. A) Expresión de Mus81 tras los tratamientos de 24h con 10mM VPA, 10µM SAHA y 100µM TMZ. B) En la imagen superior, aparece la eficacia de los dos shRNA contra Mus81. En el gráfico inferior izquierda se muestra que la disminución de la endonucleasa Mus81 no bloquea la formación de DSB (células positivas para γH2AX). En la parte derecha, se muestran los geles representativos del análisis de la fragmentación del DNA inducida por SAHA en las células U251-MG transducidas con el vector lentiviral control (vacío) y los dos shRNA contra Mus81 (HMWF: fragmentación alto peso molecular; panel superior y LMWF: fragmentación bajo peso molecular, panel inferior). NT: no tratado.

9. Caracterización del tipo de muerte celular inducida por los HDACi

El hecho de que el tratamiento con los HDACi provoque una disminución de proteínas importantes en la regulación de la entrada en mitosis como Chk1 y Wee1 y leyendo la bibliografía publicada recientemente nos llevó a pensar que la muerte celular inducida por estos fármacos podría ocurrir por catástrofe mitótica debido a la acumulación de daño en el DNA que no puede ser reparado antes de entrar en mitosis (Mir *et al.*, 2010).

En primer lugar, analizamos la morfología nuclear de células U251-MG en división después del tratamiento con 10 μ M SAHA durante 24h. Para ello realizamos la técnica de inmunofluorescencia usando anticuerpos contra survivina, TPX2, tubulina y por último, Hoechst como marcador nuclear. Una vez montadas las muestras en portaobjetos se adquirieron las imágenes en el microscopio confocal Olympus Fluoview FV500 (Figura 48).

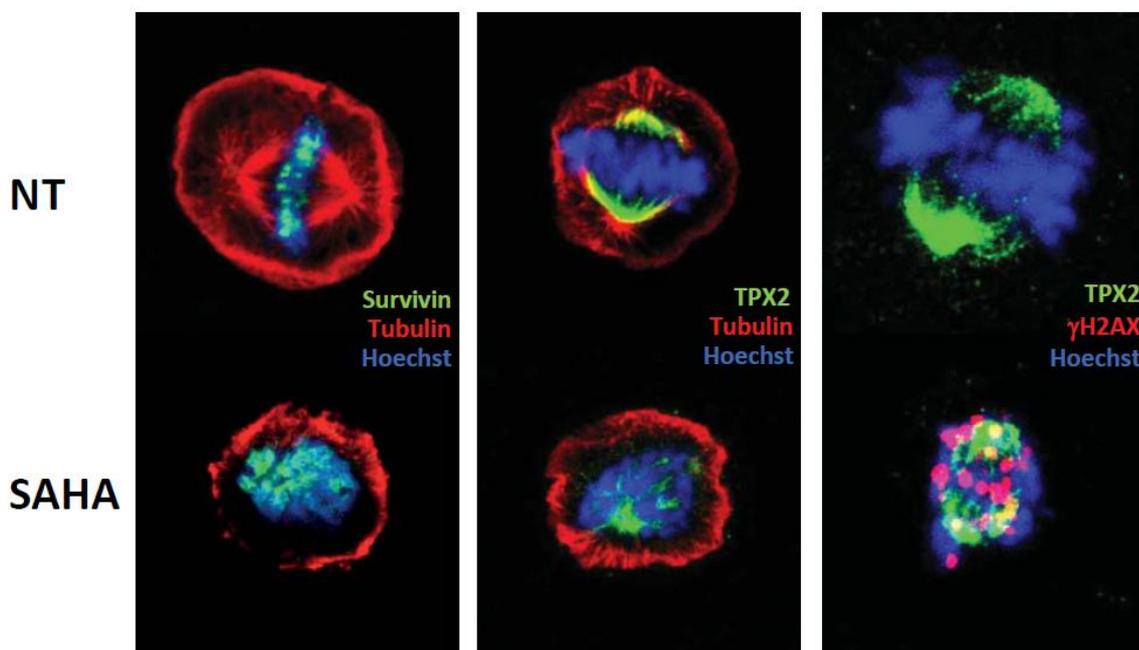


Figura 48. Análisis de las células U251-MG en metafase tras el tratamiento con SAHA. Las células fueron tratadas durante 24h con 10 μ M SAHA o dejadas sin tratar (NT). Pasado el tiempo de tratamiento, se fijaron las células con 4%PFA en PBS y se realizó la inmunofluorescencia usando anticuerpos primarios contra survivina (verde, panel izquierdo), TPX2 (verde, panel central), α -tubulina (rojo, panel izquierdo y central), γ H2AX (rojo, panel derecho) y Hoechst como marcador nuclear (azul en todos los paneles). Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal Olympus Fluoview FV500.

Tal y como se muestra en el panel superior de todas las condiciones, las células no tratadas tienen una distribución normal de los cromosomas durante la metafase y los polos mitóticos marcados con TPX2 se visualizan de forma correcta. Por el contrario, en el panel inferior donde aparecen las células tratadas con SAHA observamos que aparecen morfologías aberrantes durante la mitosis: no hay una correcta formación del huso mitótico, los cromosomas no se encuentran alineados en el centro de la placa metafásica y survivina no es reclutada en el centrómero. Todas las células observadas que se habían tratado previamente con el HDACi, presentaban morfologías mitóticas aberrantes y en ninguno de los casos pudimos encontrar células en telofase o en citocinesis. Además analizamos si las células entraban en mitosis sin haber reparado los daños en el DNA mediante la detección de DSB con el anticuerpo contra γ H2AX (Figura 48, panel derecho) y obtuvimos marcaje positivo en cromosomas metafásicos en células tratadas con SAHA, pero no en las no tratadas. Estos resultados indican que las células podrían morir debido a la entrada en mitosis con el DNA dañado y problemas en la maquinaria de segregación de los cromosomas y de formación del huso mitótico, por un mecanismo de catástrofe mitótica.

Debido a estos resultados, decidimos analizar los niveles de expresión de ambas proteínas, Survivina y TPX2 tras los tratamientos de 24h con las drogas: 10mM VPA, 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ (Figura 49).

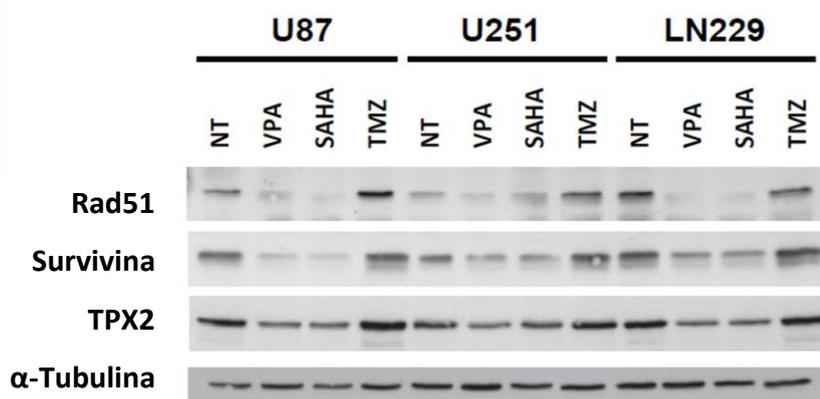


Figura 49. VPA y SAHA reducen la expresión de proteínas como Rad51, Survivina y TPX2 en las tres líneas de glioma. Las células se trataron durante 24h con los HDACi (10mM VPA y 10 μ M SAHA) y TMZ (100 μ M). Pasado ese tiempo, se lisaron las células y se prepararon muestras de 40 μ g de proteína que posteriormente fueron analizadas mediante electroforesis y western blot, usando anticuerpos específicos. NT: no tratado.

Observamos que los HDACi promueven una disminución en la cantidad de survivina y TPX2 y sin embargo, el tratamiento con TMZ no altera la expresión de éstas. Con la finalidad de completar estos resultados, se procedió a comprobar la capacidad de las células de reparar los daños en el DNA, mediante la detección de Rad51 que es una proteína importante en la maquinaria de reparación homóloga de los DSB formados en el DNA. Como se observa en la figura 49, obtenemos unos resultados similares a los anteriores, en los cuales vemos que ambos HDACi producen una disminución en la expresión de Rad51; expresión que no se ve reducida al tratar las tres líneas de glioma con TMZ. Por último, realizamos una inmunofluorescencia usando el anticuerpo específico contra Rad51 para ver cómo influye morfológicamente esta disminución en su expresión al tratarse con SAHA (Figura 50).

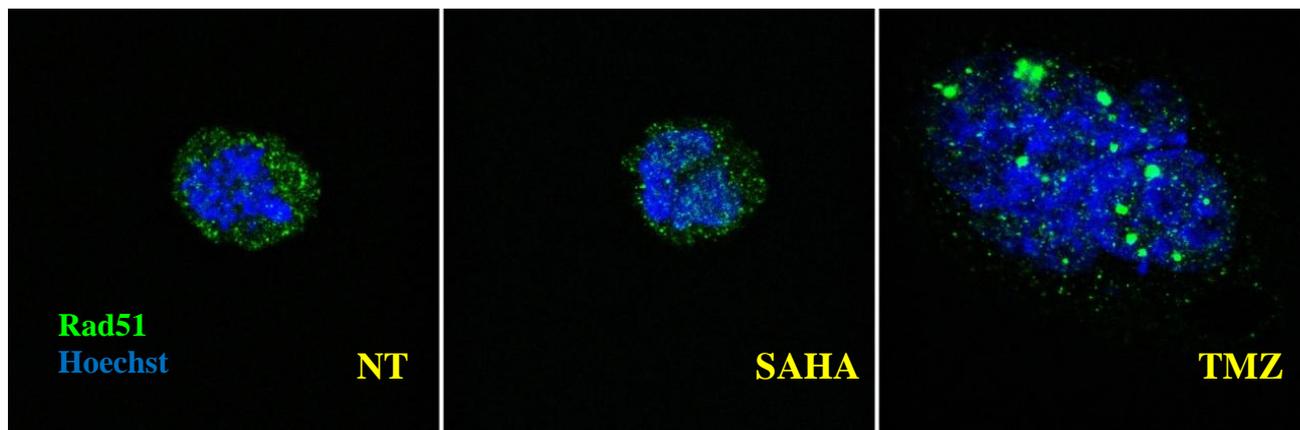
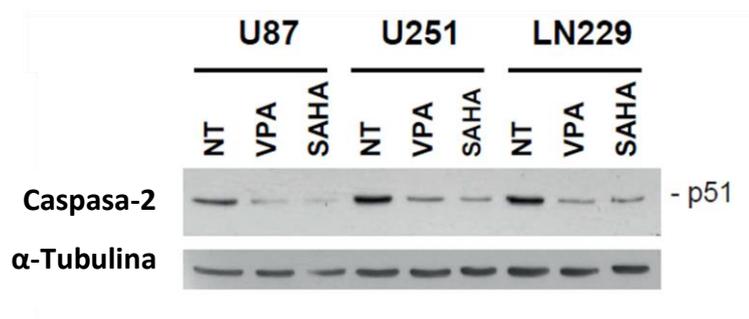


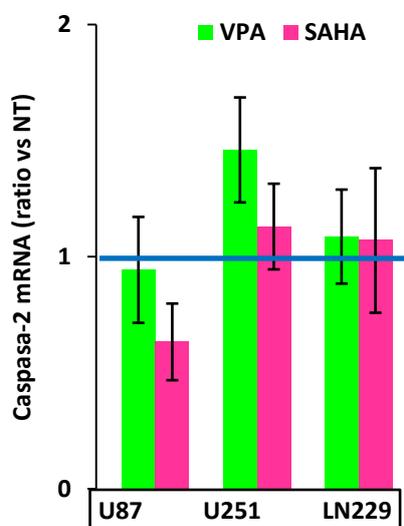
Figura 50. Células U251-MG tratadas con SAHA carecen de la formación de focos subnucleares de reparación del DNA. Las células fueron tratadas durante 24h con 10 μ M SAHA y 100 μ M TMZ. Mediante inmunofluorescencia se detectó Rad51 en verde y el DNA nuclear se visualizó con las sales de bisbenzimidazoles de Hoechst. NT: no tratado.

Para seguir profundizando en nuestra hipótesis de que las células de glioma tratadas con SAHA mueren por catástrofe mitótica, nuestro siguiente paso fue analizar la expresión, tanto de proteína como de mRNA, de caspasa-2 así como su actividad. La activación de esta caspasa se ha relacionado con los pasos iniciales de este tipo de muerte (Fava *et al.*, 2012).

A



B



C

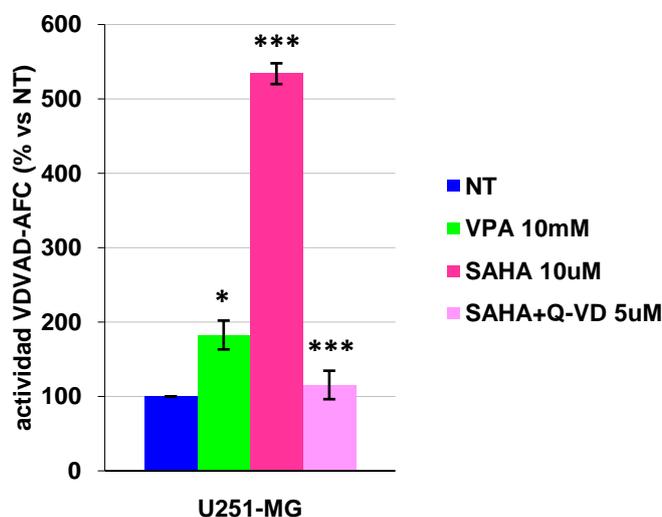


Figura 51. Análisis de la expresión y de la activación de Caspasa-2 tras los tratamientos de 24h con los HDACi en las tres líneas de glioma. A) Determinación por electroforesis y western blot de la expresión de caspasa-2 tras los tratamientos 10mM VPA y 10 μ M SAHA. B) Análisis por RT-PCR cuantitativa del mRNA de caspasa-2. Los resultados muestran el promedio de 4 experimentos independientes. C) Ensayo de actividad caspasa-2 con el sustrato fluorogénico Ac-VDVAD-AFC tras 24h de tratamiento con los HDACi y el inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh (5 μ M), en células U251-MG. NT: no tratado. Análisis estadístico mediante el test t-student, siendo *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

En la figura 51A se muestra el análisis de la cantidad de proteína de caspasa-2 donde vemos que ambos HDACi promueven una disminución importante en la cantidad de procaspasa-2 (51kDa) en las tres líneas de glioma, aunque en ninguno de los casos se detectaron los fragmentos activos de esta proteína (p32 o p18). Sin embargo, observamos que el tratamiento con los HDACi no produce variaciones significativas en los niveles del mRNA de caspasa-2 (Figura 51B). Por último, el análisis de la actividad de caspasa-2 reveló que los HDACi promueven la activación de la caspasa-2, aunque

no se llegue a detectar su procesamiento proteolítico, siendo esta activación mucho mayor cuando las células son tratadas con SAHA (Figura 51C).

Finalmente se analizó la influencia de los HDACi en el tamaño de los núcleos. Para ello se trataron las tres líneas de glioma con ambos HDACi y pasadas las 24h de tratamiento, se realizó una tinción nuclear con Hoechst y se adquirieron las fotos en el microscopio de fluorescencia (Figura 52).

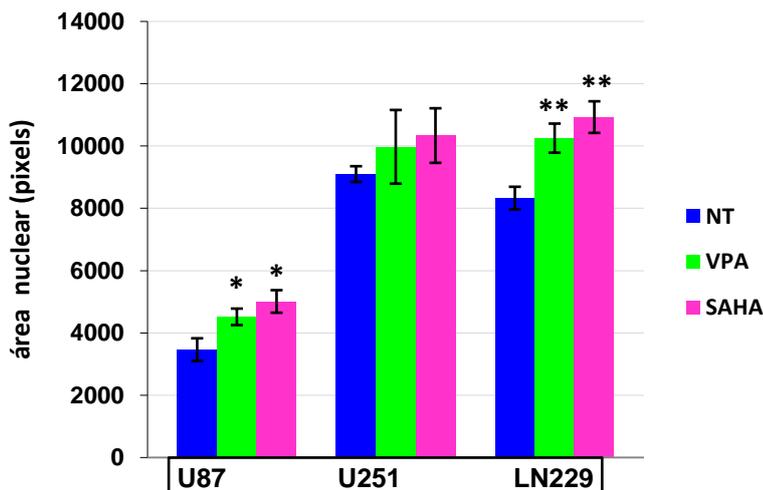


Figura 52. Los HDACi promueven un aumento del tamaño nuclear. Las tres líneas de glioma fueron tratadas durante 24h con 10mM VPA y 10 μ M SAHA. Los núcleos se tiñeron con Hoechst para ser analizados. Estos resultados muestran el promedio de 5 experimentos independientes. NT: no tratado. Análisis estadístico mediante t-student, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Tal y como se muestra en la figura, tanto VPA como SAHA promueven un incremento del tamaño de los núcleos, siendo significativo en células U87-MG y LN229. En la línea U251-MG hay una tendencia a incrementar el tamaño nuclear pero las diferencias no llegan a ser significativas, debido a la gran variabilidad de la muestra y a que son células con núcleos de mayor tamaño. La línea celular LN229 es la que presenta un mayor efecto sobre el tamaño nuclear. Este aumento en el tamaño nuclear podría ser debido a una descompactación de la cromatina inducida por la hiperacetilación de las histonas y/o un acumulo de células en G2/M, que estaría en relación con el incremento en el pico G2/M observado en los resultados del análisis del ciclo celular (Figura 44). También podría contribuir a la aparición de células gigantes, una característica que se ha descrito en los casos de células en catástrofe mitótica.

10. Análisis de los efectos de SAHA en cultivos primarios de GBM humanos

En el último apartado de esta parte, quisimos comprobar si algunos de los resultados obtenidos en las tres líneas celulares de glioma eran extensibles a células en cultivo primario de GBM humanos. Esta parte se realizó en colaboración con el grupo de la Dra Judit Herreros, quién proporcionó las células en cultivo primario aisladas de cuatro tumores humanos de GBM obtenidos de pacientes del Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Las células fueron tratadas con 10 μ M SAHA durante 24h y se lisaron para su análisis por western blot (Figura 53).

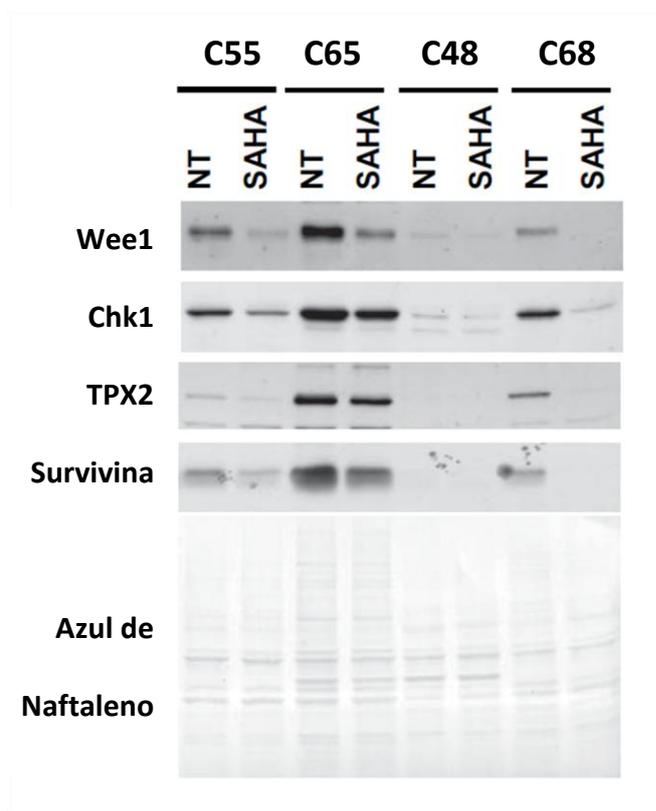


Figura 53. Análisis del efecto de SAHA en cultivos primarios de células de GBM de tumores humanos. Se muestran las imágenes de los western blots realizados con las células en cultivo primario de cuatro GBM humanos (C55, C65, C48 y C68) tratadas o no (NT) con 10 μ M SAHA durante 24h, en los cuales se ha analizado la expresión de Wee1, Chk1, TPX2 y Survivina. El control de carga se comprobó mediante tinción con azul de naftaleno de la membrana de PVDF.

De los cuatro cultivos primarios analizados (C55, C65, C48 y C68), tres de ellos mostraron una disminución en la expresión de Wee1, Chk1, TPX2 y Survivina tras el tratamiento con SAHA. Únicamente las células del cultivo C48 no muestran esta respuesta, ya que los niveles basales de todas estas proteínas son muy bajos o casi nulos. Por lo tanto los efectos producidos por SAHA en la expresión de proteínas clave para el control de la transición G2/M y la mitosis en las líneas celulares de glioma, se observan también en cultivo primario de GBM.

Parte 2

El tratamiento con TRAIL no es capaz de promover la muerte de las células de glioma, pero sí cuando se combina con los HDACi.

11. Sensibilidad de las células de glioma al ligando de receptores de muerte TRAIL

La base de muchas terapias anti-tumorales radica en la capacidad de los agentes terapéuticos de activar la apoptosis de las células cancerígenas. Aquí es donde entra el papel del ligando inductor de apoptosis, TRAIL. El uso de TRAIL recombinante es la base de muchas terapias anti-tumorales por su capacidad de activar el proceso apoptótico en muchos tipos de líneas celulares tumorales.

Puesto que se había descrito que las células de glioma suelen ser resistentes a la inducción por muerte por TRAIL, quisimos determinar si los inhibidores farmacológicos de las HDAC son capaces de sensibilizar a las tres líneas de glioma incluidas en este estudio, U87-MG, U251-MG y LN229, al ligando de muerte TRAIL.

En primer lugar, se realizaron experimentos de dosis-respuesta para analizar cuál era la respuesta de las células de glioma a las concentraciones crecientes del agente farmacológico. Las tres líneas celulares de glioma se trataron durante 48h con diferentes concentraciones del fármaco, TRAIL: 25, 50, 100 y 250ng/mL. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente figura (Figura 54):

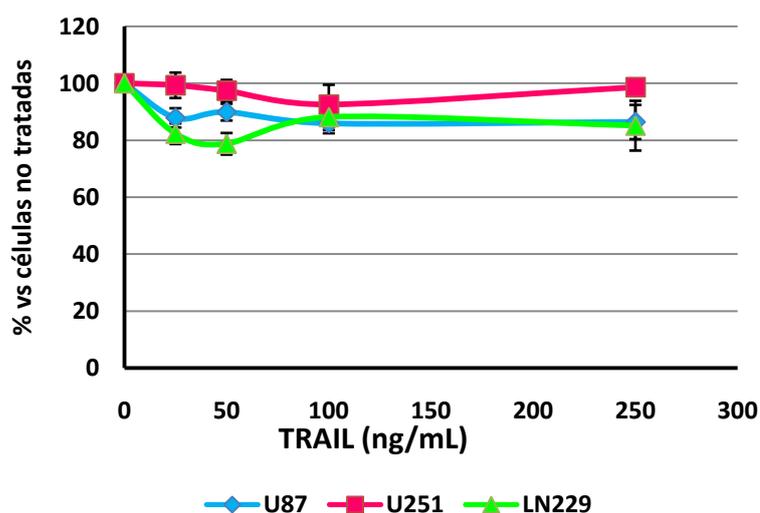


Figura 54. Ensayo de Dosis-Respuesta de las tres líneas de glioma a TRAIL. Las tres líneas de glioma se trataron durante 48h con concentraciones crecientes de TRAIL (25, 50, 100 y 250ng/mL). En estos resultados se muestra el promedio y el error estándar de la media de cada condición obtenidos a partir de 8 experimentos independientes.

Observamos que TRAIL por sí solo induce la muerte de menos del 20% de las células de glioma, sin llegar a incrementar a medida que se aumenta la dosis. Las líneas U87-MG y LN229 son las más sensibles, con una reducción de la viabilidad de aproximadamente, 15% y 20% respectivamente. Por el contrario, la línea U251-MG es totalmente resistente a todas las concentraciones utilizadas, puesto que la viabilidad no se ve reducida en ningún caso. No obstante, para posteriores experimentos, se fijará la concentración de trabajo a 100ng/mL, la dosis de uso más habitual en ensayos *in vitro*.

El siguiente paso fue analizar si la combinación del ligando TRAIL junto con los HDACi era capaz de sensibilizar las células de glioma al estímulo de muerte. Se trataron las tres líneas de glioma durante 48h con 100ng/mL TRAIL, 10mM VPA y 10 μ M SAHA de forma individual o combinado y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de viabilidad WST-1 (Figura 55).

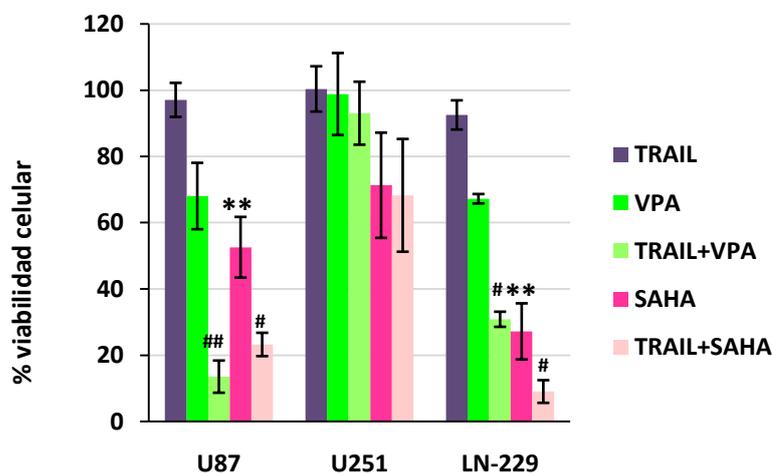


Figura 55. Ensayo WST-1 de sensibilización a TRAIL de las células de glioma. Las células de glioma se trataron 48h de forma individual o combinada con 100ng/mL TRAIL, 10mM VPA y 10 μ M SAHA. Los resultados muestran el promedio de 4 experimentos independientes. Los resultados se analizaron por el t-student siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, comparando con respecto a NT (100%); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ comparando cada condición con y sin TRAIL.

Los resultados muestran que únicamente en las líneas U87-MG y LN229 la combinación de TRAIL con cualquiera de los dos HDACi consigue sensibilizar a estas células de glioma al estímulo de muerte inducido por TRAIL. En el caso de la línea U87-MG, la sensibilización mayor se consigue cuando se combina con VPA y en el caso de la línea LN229, la disminución mayor es cuando se combina con SAHA, en ambos casos obteniéndose una disminución de casi el 80% con respecto a TRAIL solo. Sin embargo la línea U251-MG es totalmente resistente al ligando TRAIL.

12. Expresión de los receptores de TRAIL

Varios estudios han descrito la capacidad del ligando TRAIL para inducir de forma selectiva la muerte apoptótica de las células tumorales, sin afectar a las células normales del entorno. Sin embargo, nosotros no hemos observado que TRAIL tenga efectos drásticos en la viabilidad de ninguna de las tres líneas de glioma de este estudio. Es por ello que nuestro siguiente paso fue analizar qué tipos de receptores para TRAIL expresan las nuestras líneas tumorales de glioma, U87-MG, U251-MG y LN229, puesto que su insensibilidad podría ser debida a la falta de los receptores funcionales o a la sobre-expresión de los receptores señuelo. Como ya hemos descrito anteriormente, existen dos tipos de receptores a los cuales se puede unir TRAIL: receptores de muerte (DR4 ó DR5), que activan la ruta apoptótica, y los receptores señuelo, (DcR1 ó DcR2), que posiblemente inhiban la activación de la muerte por apoptosis.

Se analizó la expresión, en condiciones basales, de estos cuatro receptores mediante western blot en las tres líneas de glioma y se incluyeron las células HEK293, por ser una línea celular humana no tumoral (Figura 56).

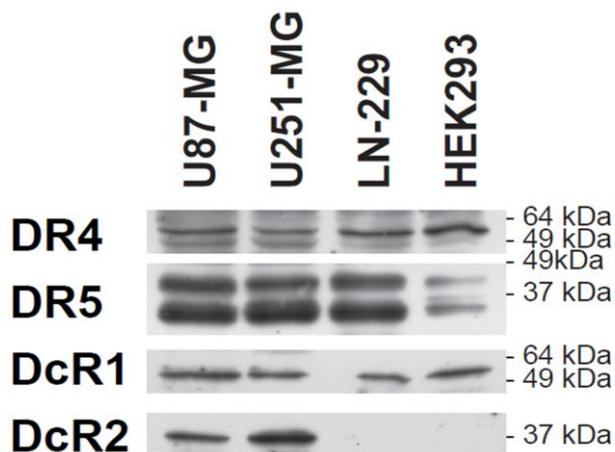


Figura 56. Expresión en condiciones normales de los receptores de muerte DR4 y DR5 y de señuelo DcR1 y DcR2. Las células de las cuatro líneas analizadas se sembraron en medio normal y al cabo de 24h se obtuvieron lisados totales y se analizaron mediante electroforesis y western blot.

Para la expresión del receptor DR4, vemos que se expresa en todas las líneas de glioma. La línea U251-MG es la que tiene una menor expresión de este receptor, hecho

que podría relacionarse con la mayor resistencia a muerte por apoptosis inducida por TRAIL que hemos observado.

El receptor DR5 presenta una expresión similar en las tres líneas de glioma analizadas.

Analizando la expresión del receptor señuelo DcR1, vemos que las tres líneas lo expresan de forma similar, mientras que, el receptor DcR2, se expresa únicamente en las líneas U87-MG y U251-MG, siendo mayor en esta última línea.

Por lo tanto las células de glioma estudiadas expresan niveles detectables de receptores de TRAIL, pero las células U251-MG son las que tienen menor expresión de DR4 y mayor expresión de DcR2, coincidiendo con una mayor resistencia.

13. Análisis de la expresión de los componentes de la vía apoptótica

13.1 Caracterización de la expresión de las caspasas en células de glioma

Nuestro siguiente objetivo fue analizar la expresión de las principales caspasas iniciadoras, caspasa-8, caspasa-9, y las caspasas efectoras, caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7 (Figura 57) en las tres líneas de glioma y como línea control, se utilizaron células HEK293.

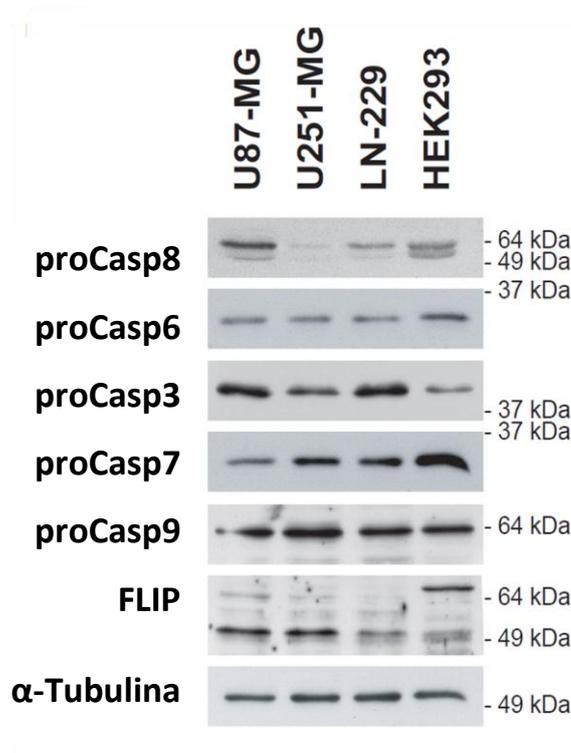


Figura 57. Expresión en condiciones normales de las principales caspasas implicadas en la muerte por apoptosis. Las células de las tres líneas de glioma se analizaron mediante electroforesis y western blot sin previo tratamiento. Como muestra control, utilizamos células HEK293. Las proteínas detectadas se indican a la izquierda de cada imagen. El control de carga del western blot se analizó con el anticuerpo específico, anti- α -tubulina.

Tal y como se muestra en la figura 57, la caspasa-8 se expresa a niveles muy distintos en las tres líneas de glioma, siendo la U87-MG la que más la expresa, seguida

de la línea LN229, mientras que la U251-MG expresa niveles muy bajos. La caspasa iniciadora de la vía mitocondrial, caspasa-9, se expresa casi por igual en las tres líneas de glioma, siendo quizá un poco mayor en la línea U251-MG.

Con lo que respecta a las caspasas efectoras, la caspasa-6, mantiene niveles de expresión similares en las tres líneas. La caspasa-3 se expresa de forma similar en las líneas U87-MG y LN-229, siendo menor en la línea U251-MG. Por último, la caspasa-7 tiene unos niveles de expresión similares en las líneas U251-MG y LN229, siendo algo menor para la línea U87-MG.

También analizamos la expresión de c-FLIP como regulador de la activación de la caspasa-8. Observamos que las células de glioma no expresan niveles detectables de c-FLIP_L (55kDa), banda que sí aparece en la muestra control de células HEK293. Sin embargo se observa la expresión de una proteína de menor tamaño, que puede corresponder al fragmento N-terminal de c-FLIP_L, p43-c-FLIP_L, en las tres líneas de glioma, siendo menor la expresión para la línea LN229 si la comparamos con las otras dos líneas, U87-MG y U251-MG donde observamos que ambas tienen unos niveles de expresión similares.

13.2 Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en células de glioma

A continuación caracterizamos la expresión de los componentes de la familia Bcl-2 en las tres líneas tumorales de glioma y en las células HEK293, proteínas importantes en la regulación de la implicación de la vía mitocondrial en la apoptosis. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 58).

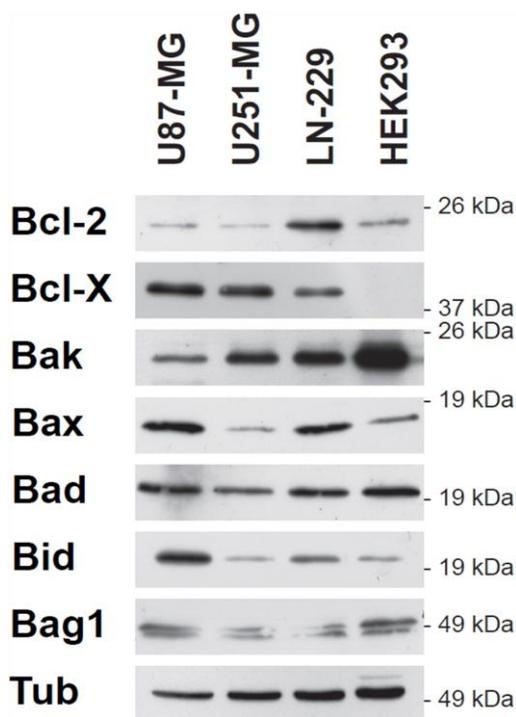


Figura 58. Expresión de los componentes de la familia Bcl-2 en las tres líneas de glioma y células HEK293. Las muestras corresponden a condiciones basales (no tratadas) de las cuatro líneas celulares. Tub: α -tubulina.

Por una parte, analizamos la expresión de diferentes miembros de la familia Bcl-2 con funciones anti-apoptóticas, como son Bcl-2, Bcl-X_L y Bag1. Bcl-2 y Bcl-X_L son proteínas que inhiben la activación de la apoptosis. Vemos que la línea LN229 es la que presenta una mayor expresión de esta proteína, seguida de las líneas U87-MG y U251-MG, mientras que para Bcl-X_L, se observa justo lo contrario. Las líneas U87-MG y U251-MG son las que la expresan más, seguida de la línea LN229. Las células HEK293 no expresan Bcl-X_L. La expresión de Bag1 es similar en las tres líneas de glioma analizadas.

Por otra parte, también caracterizamos los niveles de expresión de las proteínas pro-apoptóticas: Bak, Bad y Bax y la proteína que conecta la vía extrínseca con la intrínseca, Bid. De forma global se observa que hay muchas diferencias en el patrón de expresión de las tres líneas de glioma, Bak se expresa menos en las células U87-MG mientras que la línea U251-MG presenta menor expresión de Bax y de Bad, hecho que puede contribuir a su mayor resistencia a TRAIL. Por último, determinamos la expresión de Bid, que se encuentra con mayor expresión en la línea U87-MG en comparación con las líneas U251-MG y LN229.

13.3 Análisis de la activación de caspasas

En este punto, quisimos caracterizar si los agentes farmacológicos activaban la vía apoptótica, tanto la vía extrínseca como la intrínseca, en las tres líneas celulares de glioma.

En primer lugar, se analizó la expresión y el corte de caspasa-8 y caspasa-3. La caspasa-8 está implicada en la vía extrínseca y se activa tras la unión de TRAIL con su respectivo receptor, DR4 y/o DR5, por lo tanto, se trata de una caspasa iniciadora de la apoptosis. Por otro lado, determinamos la expresión de la caspasa-3, como caspasa efectora. Esta caspasa es el punto de confluencia de las dos vías, extrínseca e intrínseca, por lo que, será activada o bien por caspasa-8 (vía extrínseca) o bien por caspasa-9 (vía intrínseca).

Las tres líneas de glioma fueron tratadas durante 24h con 10 μ M SAHA, 100ng/mL TRAIL, SAHA combinado con TRAIL y, finalmente, esta última combinación junto con el inhibidor de caspasas Q-VD-Oph (5 μ M). Los lisados celulares se analizaron mediante electroforesis y western blot. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura 59:

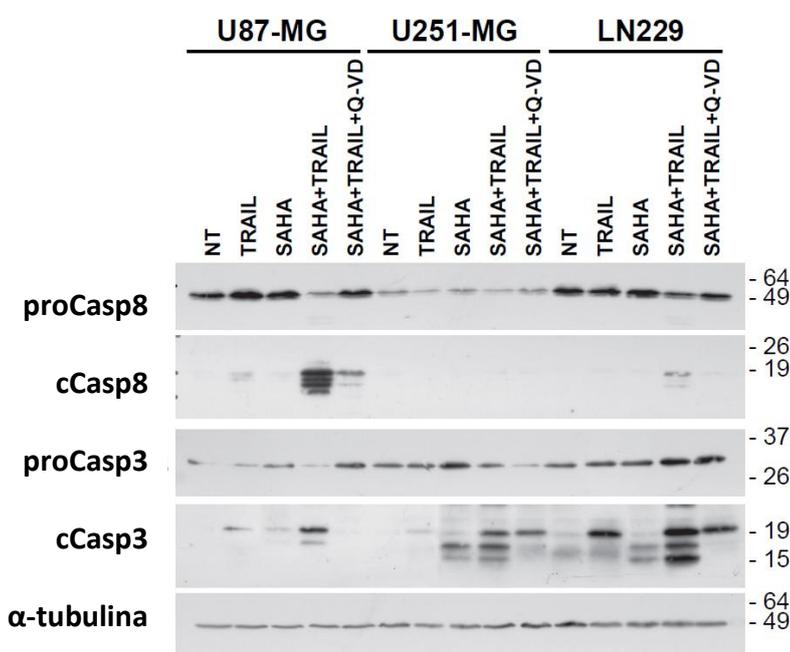


Figura 59. Expresión y activación de caspasa-8 y caspasa-3 en las tres líneas de glioma. Las células fueron tratadas, individualmente o en combinación, durante 24h con 100ng/mL TRAIL, 10 μ M SAHA, 5 μ M Q-VD-Oph (Q-VD). Las formas inactivas de las caspasas, se representan como pro-Casp, mientras que las formas activas se identifican de la forma cCasp (*cleaved-caspase*). La tubulina muestra al control de carga de los blots. NT: no tratado.

En el panel superior de la imagen 59 aparece representada la expresión y activación de la caspasa-8. Tal y como ya hemos mencionado en el apartado 13.1 la expresión de la pro-caspasa-8 es muy inferior en la línea U251-MG, hecho que podría explicar la gran resistencia de esta línea al tratamiento con TRAIL. Para las otras dos líneas se observa una reducción de la banda con el tratamiento combinado de SAHA con TRAIL que se corresponde con la aparición de las bandas de caspasa-8 cortada y, por lo tanto, la forma activa. Esta activación es inhibida parcial o completamente al combinar el tratamiento con el inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh, en las líneas U87-MG y LN229, respectivamente. Además, únicamente en la línea U87-MG vemos un procesamiento, aunque mucho menor, con el tratamiento individual con TRAIL.

En el panel inferior de la figura 59 se muestra un blot representativo de la expresión y activación de caspasa-3 en las tres líneas de glioma. Con lo que respecta a la forma inactiva de esta caspasa, vemos que la línea LN229 es la que tiene una expresión ligeramente mayor con respecto a las otras dos líneas. En general, los tratamientos farmacológicos no alteran de forma significativa la expresión de esta pro-caspasa, pero sí promueven su activación por corte. Se observa que TRAIL es capaz de promover su procesamiento en las líneas U87-MG y LN229, pero no en las células U251-MG. Es interesante remarcar que el tratamiento individual con SAHA promueve la activación de esta caspasa en las tres líneas celulares, como ya hemos visto anteriormente. Sin embargo, es la combinación de SAHA con TRAIL la que produce un incremento mayor en la activación de caspasa-3. Como es de esperar, en las tres líneas, el inhibidor de caspasas Q-VD-OPh, es capaz de bloquear su procesamiento proteolítico.

Por último, analizamos la expresión y activación de caspasa-9, la caspasa iniciadora implicada en la vía intrínseca de la apoptosis, utilizando las mismas condiciones de tratamiento que en el experimento anterior.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura 60:

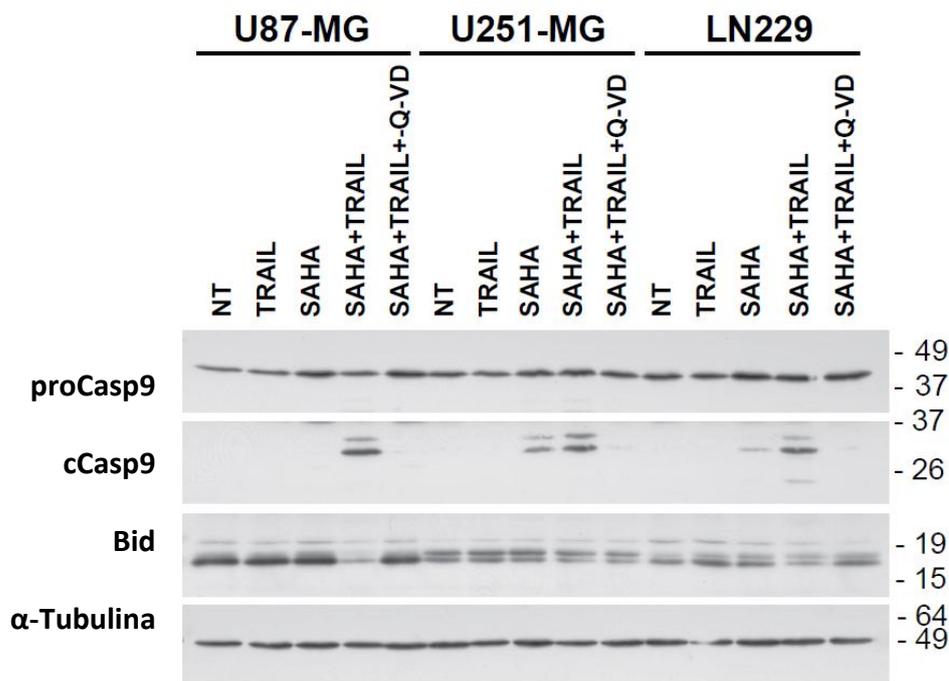


Figura 60. Expresión y activación de caspasa-9 a las 24h de tratamiento. Las tres líneas de glioma se trataron, de forma individual o combinada, con 10 μ M SAHA, 100ng/mL TRAIL y 5 μ M Q-VD-Oph. La parte superior del panel representa la pro-forma de la caspasa-9 (proCasp9, 45 kDa) y la parte central los fragmentos procesados (cCasp9, 37 y 35 kDa). El panel inferior corresponde a la proteína Bid. NT: no tratado

Para pro-caspasa-9 (45 kDa), observamos que SAHA promueve un incremento en la intensidad de las bandas que se mantiene al combinarlo con TRAIL y Q-VD-Oph. El análisis del procesamiento proteolítico de caspasa-9, muestra que SAHA promueve la activación de caspasa-9 en las líneas U251-MG y LN229, implicando la activación de la vía mitocondrial. La combinación de SAHA con TRAIL produce un mayor procesamiento de caspasa-9 en las tres líneas de glioma. Así mismo la adición del inhibidor de caspasas bloquea totalmente el procesamiento de la caspasa-9 en las tres líneas de glioma que coincide con la disminución en la intensidad de la banda de Bid, aunque no se llega a detectar la banda de Bid truncado. Estos resultados sugieren que con el tratamiento combinado de SAHA con TRAIL se establece la conexión entre la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis, lo que permite una amplificación de la señal. Como es de esperar la adición del inhibidor de caspasas bloque totalmente el procesamiento proteolítico de caspasa-9 en las tres líneas de glioma.

13.4 Caracterización del efecto de los inhibidores de las HDAC en la expresión de las principales caspasas implicadas en la apoptosis

Para determinar qué efecto producen los tratamientos con los inhibidores de las HDAC, VPA y SAHA, analizamos mediante western blot la expresión de las diferentes caspasas iniciadoras y efectores implicados en la muerte por apoptosis.

Las células fueron tratadas durante 24h con los agentes farmacológicos: 10mM VPA y 10 μ M SAHA. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura 61:

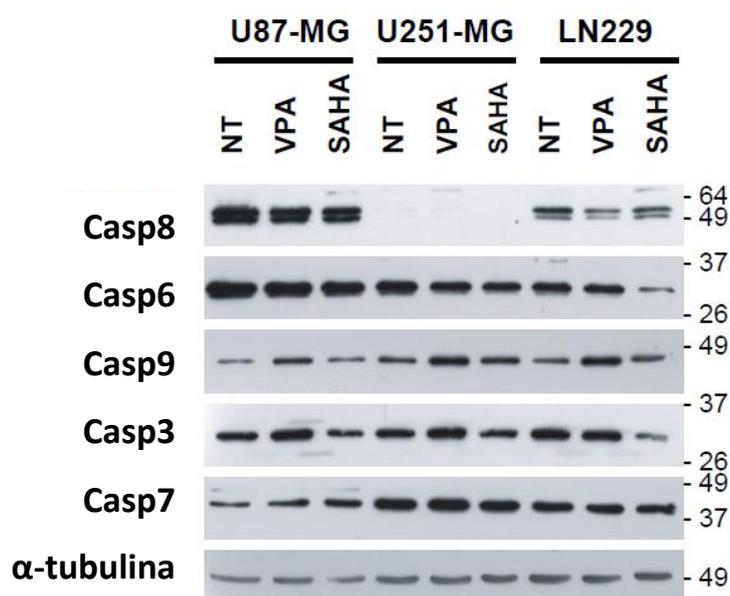


Figura 61. Análisis del efecto causado por los HDACi en las principales caspasas implicadas en apoptosis. Las tres líneas celulares de glioma fueron tratadas durante 24h con 10mM VPA y 10 μ M SAHA. Los lisados se analizaron mediante electroforesis y western blot, utilizando anticuerpos específicos contra caspasa-8, caspasa-6, caspasa-9, caspasa-3 y caspasa-7. NT: no tratado.

De forma generalizada, los cambios más claros se observan con el tratamiento con VPA que producen un incremento de la expresión de caspasa-9 y caspasa-3, pero no se observan cambios debidos al tratamiento con SAHA, ni cambios notables en la expresión de otras caspasas.

13.5 Análisis del efecto de los inhibidores de las HDAC en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2

Del mismo modo que en el apartado anterior, una vez hemos determinado la expresión basal de los componentes de la familia Bcl-2, nuestro siguiente paso fue analizar cómo afectaban los tratamientos farmacológicos con VPA y SAHA en la expresión de estas proteínas.

Las células fueron tratadas durante 24h con los HDACi: 10mM VPA y 10 μ M SAHA. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura 62:

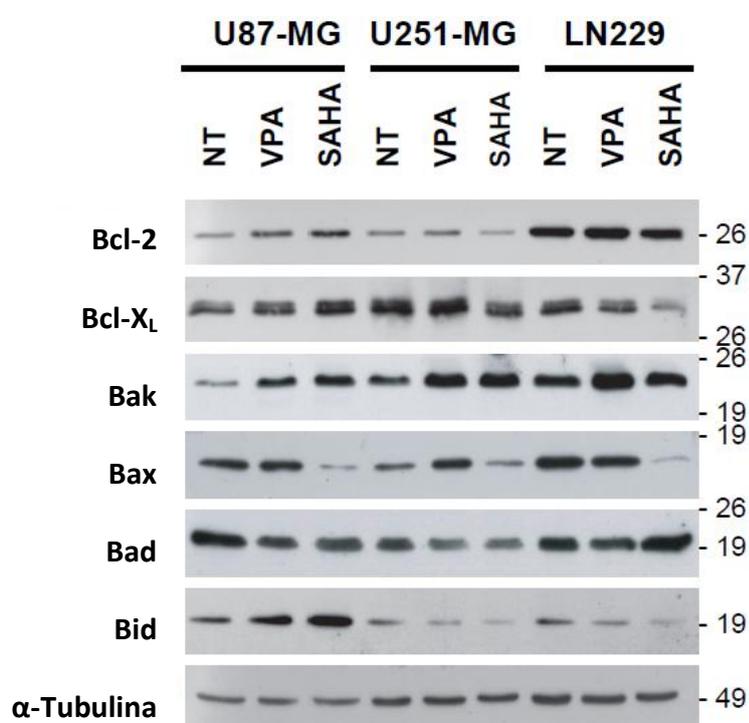


Figura 62. Efecto de los inhibidores de las HDAC en los principales componentes de la familia Bcl-2. Las tres líneas celulares de glioma se trataron durante 24h con 10mM VPA y 10 μ M SAHA. El control de carga se determinó con el anticuerpo específico anti- α -tubulina. NT: no tratado.

Los inhibidores de las HDAC afectan sobre todo a las proteínas con funciones pro-apoptóticas. En primer lugar en las tres líneas de glioma, VPA y SAHA, promueven un aumento en la expresión de Bak, y por otro lado, SAHA produce una disminución en la expresión de Bax. No se observan diferencias en la expresión de Bad y Bid tras el tratamiento con ambos HDACi.

14. Sensibilización de las células U251-MG a la muerte por TRAIL

Observando los resultados anteriores en los que veíamos que la línea U251-MG, tiene niveles basales de caspasa-8 muy inferiores en comparación con las otras dos líneas y sabiendo también que esta línea es resistente a la muerte inducida por TRAIL; el siguiente paso fue determinar si la sobre-expresión de caspasa-8 tenía efecto sobre la resistencia a TRAIL.

En primer lugar, se transdujeron las células U251-MG con el lentivirus de sobre-expresión para caspasa-8, al mismo tiempo que en otra placa añadimos un virus que contiene un vector vacío como control. Una vez comprobado que las células se han transducido correctamente mediante microscopía de fluorescencia (el plásmido contiene el cDNA de la proteína fluorescente verde, GFP), tratamos de forma individual o combinada con 100ng/mL TRAIL y/o 10 μ M SAHA durante 24h.

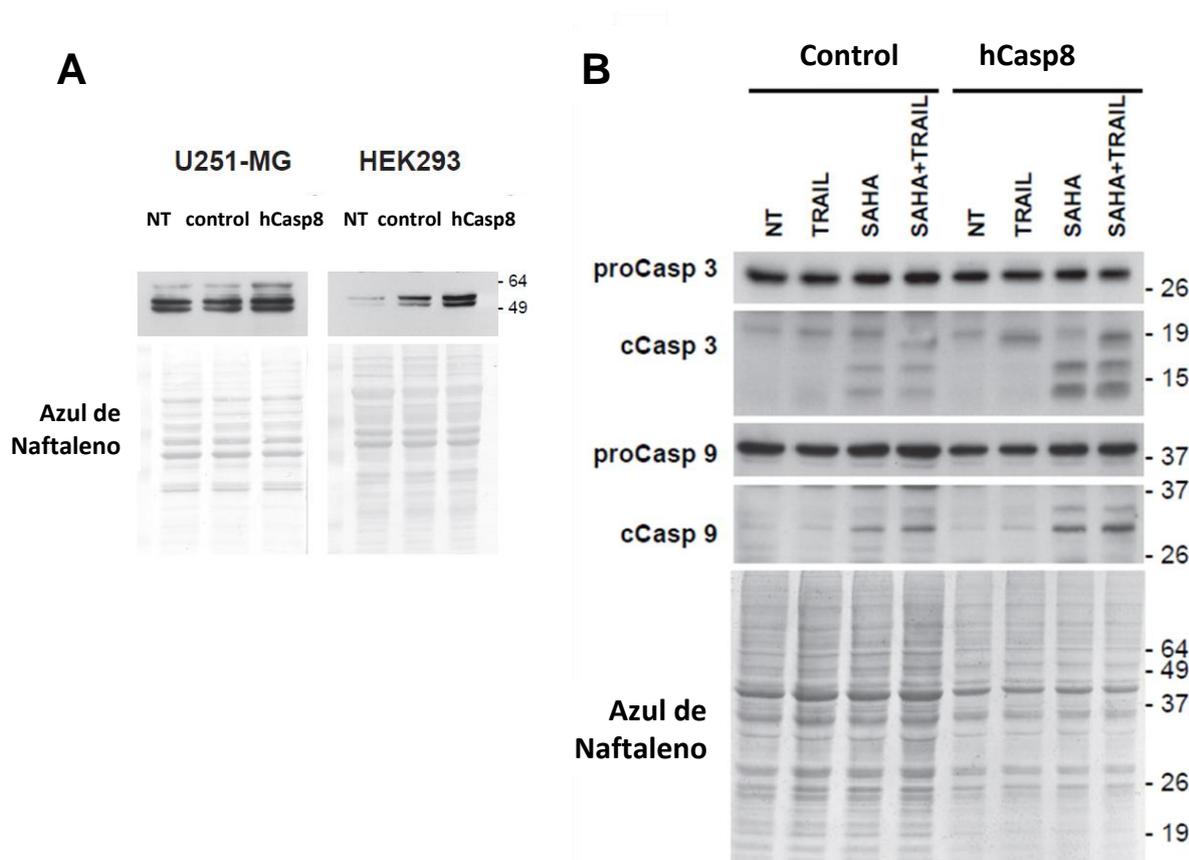


Figura 63. Sobre-expresión de caspasa-8 en las células U251-MG. A) Comprobación por western blot del funcionamiento del plásmido de sobre-expresión para caspasa-8 en las células U251-MG y HEK293. B) Análisis de la expresión y activación de las caspasas-3 y -9 después de los tratamientos individuales o combinados de 100ng/mL TRAIL y/o 10 μ M SAHA durante 24h en la línea U251-MG. NT: no tratado.

En la figura 63A, se muestra el análisis de la expresión de caspasa-8 en las células U251-MG y HEK293, que usamos como control. Vemos que en ambos casos la sobre-expresión ha funcionado, aunque el incremento en la expresión de caspasa-8 es mayor en células HEK293 que en las células de glioma.

A continuación analizamos si la sobre-expresión de caspasa-8 tenía algún efecto sobre la activación de las caspasas-3 y -9 tras añadir los tratamientos (Figura 63B). En la parte superior del panel observamos que la sobre-expresión de caspasa-8 da lugar a una mayor activación de caspasa-3 en las condiciones de tratamiento de SAHA y SAHA con TRAIL, y lo mismo ocurre con caspasa-9 (panel inferior). Sin embargo, TRAIL sigue sin ser capaz de promover la activación de ninguna de las dos caspasas a niveles detectables.

Por último, quisimos determinar si la sobre-expresión de caspasa-8 en las células U251-MG, es capaz de sensibilizar a la muerte tras los tratamientos con VPA, SAHA y TRAIL.

Para llevar a cabo este experimento, se usó el ensayo de viabilidad con el reactivo WST-1. Las células fueron tratadas durante 48h con 100ng/mL TRAIL, 10mM VPA y 10 μ M SAHA, de forma individual o combinada. Para este experimento se utilizaron dos controles: células no transducidas (NT) y células transducidas con el vector vacío (control). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura 64:

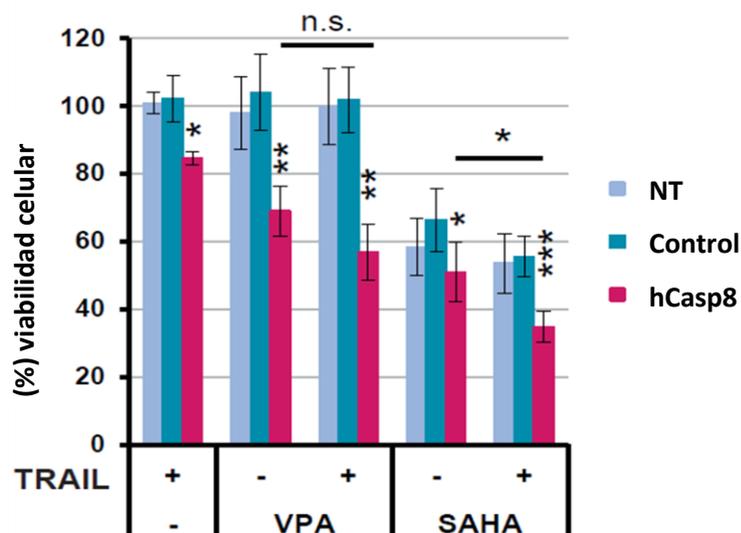


Figura 64. Sensibilización de las células U251-MG a los tratamientos con los inhibidores de las HDAC y TRAIL. Las células fueron primero transducidas con el vector de sobre-expresión de caspasa-8 o el vector vacío (control) y después fueron tratadas durante 48h con los agentes farmacológicos. Estos resultados muestran el promedio de 5 experimentos independientes (n.s. no significativo). NT: células no transducidas. Análisis estadístico mediante el test t-student, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tal y como se esperaba las células no transducidas y las transducidas con el vector vacío (control) se comportan de forma similar. Observamos que TRAIL en las células control no reduce la viabilidad celular, mientras que en células que están sobre-expresando caspasa-8 hay una disminución significativa de la viabilidad celular de casi un 20%.

El tratamiento con VPA no afecta a la viabilidad celular en las células control. Sin embargo, en células que sobre-expresan caspasa-8, la viabilidad se ve reducida de forma significativa en casi un 35% y el efecto es mayor cuando VPA se combina con TRAIL, llegándose a reducir aproximadamente 40%.

Por último, el tratamiento con SAHA produce una disminución de la viabilidad celular de casi un 40% en células control, mientras que en células que están sobre-expresando caspasa-8, la viabilidad disminuye hasta un 50%. Además el tratamiento combinado de SAHA con TRAIL produce una disminución mayor de la viabilidad de las células, alcanzando cifras de casi el 65% de muerte.

Por lo tanto la introducción de un vector de expresión de caspasa-8 en las células U251-MG permite restaurar parcialmente la sensibilidad de las células a TRAIL, y obtener una respuesta a la combinación de TRAIL con SAHA similar a la observada en las otras dos líneas de glioma, las células U87-MG y LN229, resultados que indican que estas células han adquirido como uno de los mecanismos de resistencia a la muerte por apoptosis la reducción en la expresión de caspasa-8.

DISCUSIÓN

Parte 1

Las terapias anti-tumorales convencionales no siempre son efectivas, y menos en los tumores con gran capacidad de infiltración y resistencia a los tratamientos, como el glioblastoma multiforme. Además la mayoría de los fármacos utilizados presentan baja selectividad y no son capaces de distinguir entre células normales y tumorales, derivando así en mayores efectos secundarios para los pacientes. De ahí surge la necesidad de seguir investigando y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con fármacos más selectivos y que disminuyan así los efectos secundarios que producen las terapias actuales en los pacientes tratados.

La inhibición de las HDAC con fármacos específicos (HDACi) se ha convertido en una estrategia prometedora para sensibilizar distintos tipos de células tumorales a las terapias anti-tumorales. Los efectos de estos fármacos son la inhibición del crecimiento, la diferenciación y la muerte de las células tumorales, sin afectar a las células normales (Burgess *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2010).

En este primer bloque, analizamos los efectos de los inhibidores de las HDAC que conducen finalmente a la muerte de las tres líneas de glioma incluidas en este estudio.

1. Los inhibidores de las HDAC reducen la viabilidad, la capacidad proliferativa y la clonogenicidad de las células de glioma *in vitro*

Las células tumorales se caracterizan por una proliferación incontrolable, gran resistencia a los fármacos y, por el desarrollo de mecanismos de resistencia a la muerte. Es por ello que un buen agente farmacológico anti-tumoral debe de ser capaz de inhibir la proliferación, inhibir la migración para evitar la infiltración y la formación de metástasis, y provocar la muerte de las células tumorales sin que afecte a las células normales de alrededor.

Los ensayos de viabilidad muestran que la inhibición *in vitro* de las HDAC en las tres líneas de glioma disminuye la viabilidad de una forma dosis dependiente, siendo SAHA el tratamiento más efectivo. Estos ensayos se correlacionan con otros estudios, en los que el tratamiento con SAHA de varias líneas celulares de glioma inhibían el crecimiento de las células tumorales en un rango de 1-10 μ M (Eyüpoglu *et al.*, 2005). Del mismo modo, estos ensayos nos han servido para fijar la concentración de trabajo, siendo: 10-15mM VPA y 10 μ M SAHA; concentraciones de uso habitual en estudios *in vitro* con células tumorales (Yagi *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

El anticuerpo monoclonal Ki-67 detecta un antígeno nuclear humano presente en células que están proliferando, pero no en células quiescentes (Gerdes *et al.*, 1991). Éste se aplica como biomarcador de proliferación en la mayoría de tumores y se ha demostrado su valor pronóstico. Además también permite medir la efectividad de las terapias médicas, asegurando una rápida evaluación de las nuevas drogas de forma fácil, económica y reproducible (Urruticoechea *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que ambos HDACi promueven una disminución del porcentaje de células que expresan Ki-67, por lo tanto VPA y SAHA tienen efectos anti-proliferativos sobre las tres líneas celulares de glioma. Así mismo los HDACi reducen significativamente la formación de clones, demostrando que tienen efectos sobre la capacidad de las células de volver a entrar en ciclo, una vez dejan de estar expuestas al fármaco. Estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad y con otros ya publicados en los que se observa que la acetilación de histonas va acompañada de una fuerte disminución del re-crecimiento clonogénico de las células tumorales (Flatmark *et al.*, 2006).

En general, hemos observado que a las concentraciones habituales de uso *in vitro* SAHA produce mayores efectos que VPA. Las diferencias de sensibilidad entre

VPA y SAHA se podrían explicar por el hecho de que SAHA inhibe las HDAC de clase I y II, mientras que VPA es específico de las de clase I (Dickinson *et al.*, 2010). Varios estudios han demostrado que la inhibición de la HDAC6 (clase II) aumenta la muerte de las células tumorales induciendo daño al DNA, de forma que la inhibición de la HDAC6 por parte de SAHA podría producir una sensibilización mayor de las células tumorales a otros agentes anti-cancerígenos (Namdar *et al.*, 2010).

En resumen, podemos concluir que el tratamiento *in vitro* de las células de glioma con los HDACi produce una disminución en la viabilidad celular, afectando también a la capacidad proliferativa y a la clonogenicidad de las células de glioma.

2. Los HDACi promueven condensación nuclear y la activación de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis

Durante la apoptosis se pueden diferenciar varios cambios morfológicos en las células. En las etapas tempranas de la apoptosis, se observa cómo las células comienzan a encogerse y se empiezan a condensar los núcleos (picnosis) (Kerr JFR, 1972). La picnosis es el resultado de la condensación de la cromatina y es una de las características principales de la apoptosis (Elmore, 2007). A continuación se produce la formación de burbujas en la membrana nuclear, la disolución completa de la cromatina (cariólisis) y la separación de fragmentos nucleares en los cuerpos apoptóticos, muy típicos de observar en células que mueren por apoptosis (Zamzami and Kroemer, 1999).

En las células de glioma tratadas con los HDACi se observa, mediante la tinción nuclear con Hoechst 33342, condensación nuclear y la aparición de morfologías nucleares aberrantes. Sin embargo, no encontramos fragmentación nuclear, muy frecuente en células apoptóticas y tampoco con el inductor de la apoptosis, TRAIL, indicando que las células de glioma cuando son tratadas con los HDACi o con un activador de la vía extrínseca no producen la fragmentación nuclear típica de la apoptosis.

La mayoría de los cambios morfológicos que se observan durante la apoptosis son debidos a la acción de las caspasas (Hengartner, 2000; Budihardjo *et al.*, 1999). El análisis de la expresión de las principales caspasas implicadas en las vía extrínseca e

intrínseca de la apoptosis ha revelado que el tratamiento con los HDACi produce la activación por corte proteolítico de caspasa-9 y caspasa-3, así como el procesamiento de la fodrina (sustrato final de las caspasas) y un incremento en la actividad caspasa-3; pero no llegamos a observar activación de caspasa-8. Estos resultados sugieren que los HDACi promueven la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis en las líneas celulares de estudio, como ya habían descrito previamente otros grupos en distintos tipos de células tumorales: linfoma cutáneo de células T (Zhang *et al.*, 2005), leucemia (Bernhard *et al.*, 1999; Peart *et al.*, 2003), linfoma de células B (Lindemann *et al.*, 2007), células de cáncer de mama (Huang and Pardee, 2000), neuroblastoma (Mühlethaler-Mottet *et al.*, 2008), células de cáncer hepático (Wang *et al.*, 1998) y células de cáncer pancreático (Haefner, 2008), entre otras. Además, puesto que la adición del inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh, revierte la toxicidad inducida por SAHA en las tres líneas de glioma, se confirma que la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis contribuye de forma significativa a la muerte inducida por los HDACi.

3. Los HDACi promueven la fragmentación del DNA en las líneas de glioma, dependiente de la activación de caspasas y la nucleasa CAD

La activación de los componentes implicados en la apoptosis es la responsable de los cambios morfológicos observados en este tipo de muerte, incluyendo daño mitocondrial, rotura de la envoltura nuclear, fragmentación del DNA, condensación de la cromatina y la formación de los cuerpos apoptóticos (Thornberry, 1998). Una de las marcas bioquímicas de la apoptosis es la forma característica de degradar el DNA en la cual el genoma es cortado en sitios internucleosomales, lo que genera un patrón en escalera (*ladder*) de fragmentos de DNA cuando se migra en una electroforesis (Compton, 1992).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con SAHA causa fragmentación del DNA de alto peso molecular en las células de glioma, mientras que en lo referido a la fragmentación de bajo peso molecular no se observa el patrón característico de degradación en escalera, apareciendo una distribución de los fragmentos en forma difusa. Además, observamos que la adición del inhibidor de caspasas bloquea la fragmentación tanto de alto como de bajo peso molecular indicando

que, a pesar de que la inactivación de las caspasas no bloquea completamente la muerte inducida por los HDACi, las caspasas tienen un papel importante en la degradación final del DNA cromosómico, como ya se ha observado en estudios previos con células de cáncer de pulmón y próstata (Sonnemann *et al.*, 2006).

Hemos visto que la sobre-expresión de Bcl-X_L en células U251-MG bloquea completamente la fragmentación de DNA tanto de alto como de bajo peso molecular, lo que apoya el papel de la vía mitocondrial en la degradación final del DNA cromosómico que se produce tras la muerte de las células de glioma, como ya se ha publicado en otros trabajos en líneas celulares de linfoblastoide B y T (Scaffidi *et al.*, 1998; Vander Heiden *et al.*, 1997).

Se describió que la activación de la nucleasa CAD era la responsable de la degradación internucleosomal del DNA durante la apoptosis y la chaperona ICAD actuaba inhibiendo este proceso (Sakahira *et al.*, 1998). Bajo un estímulo apoptótico, CAD necesita estar localizada en el núcleo para poder degradar la cromatina. Se ha visto que en situaciones en que las células son defectivas en la generación de fragmentación del DNA en forma de escalera, CAD no se detecta en la fracción citosólica. También se observó que en células que carecen de degradación de bajo peso molecular, la sobre-expresión de CAD induce la degradación internucleosomal típica con patrón electroforético en forma de escalera (Iglesias-Guimaraes *et al.*, 2012). Este hecho podría explicarnos por qué cuando las células de glioma son tratadas con los HDACi, no observamos la aparición de LMWF típica. Quizá la cantidad de proteína CAD que se encuentra en el citosol es muy baja y su activación por parte de caspasa-3 libera muy pequeña cantidad de CAD activa no siendo suficiente para producir la degradación en forma de escalera.

Nuestros resultados muestran que la disminución en la expresión de CAD en células U251-MG previene la formación de fragmentos de 50Kbp (HMWF) tras el tratamiento con SAHA y también previene la fragmentación LMWF. Esto indica que la endonucleasa CAD es necesaria para la formación de los fragmentos de 50Kbp inducida por SAHA y la posterior degradación en fragmentos más pequeños. Esto sugiere que la fragmentación de alto peso molecular es necesaria para que la fragmentación de bajo peso molecular, LMWF, tenga lugar.

Sin embargo, se conoce que además de CAD existen varias nucleasas que podrían contribuir igualmente a la fragmentación internucleosomal observada durante la apoptosis; incluyendo NUC70, DNase X, DNase- γ , EndoG y AIF, entre otras. En las

células de mamífero se ha observado que la fragmentación internucleosomal ocurre de forma dependiente del Ca^{2+} intracelular. Se ha visto que CAD no depende de Ca^{2+} y que su expresión es necesaria para la formación de fragmentos de 50Kbp. Sin embargo, para procesar estos fragmentos en otros de 200bp necesita la cooperación de otra endonucleasa que sea dependiente de Ca^{2+} intracelular. Recientemente, se ha sugerido una cooperación entre CAD y DNAS1L3 (endonucleasa dependiente de la unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ que se localiza en el retículo endoplasmático) durante la fragmentación internucleosomal del DNA que tiene lugar en la apoptosis (Errami *et al.*, 2013). Por lo tanto en el caso del tratamiento con los HDACi de las células de glioma, podría tener lugar la activación de CAD, pero no la activación y/o translocación al núcleo de DNAS1L3, con lo cual se podrían formar los fragmentos de 50Kbp pero no la fragmentación internucleosomal.

El hecho de que se produzcan fragmentos de alto peso molecular con un patrón difuso cuando se reduce la expresión de CAD, que no observamos cuando se inhiben las caspasas ni cuando se sobre-expresa Bcl-X_L, sugiere que CAD no es la única nucleasa responsable de la degradación final del DNA cromosómico, sino que actuaría junto con otras nucleasas que serían activadas como consecuencia de la activación de caspasas y que participarían en los procesos iniciales de degradación del DNA, siendo así las responsables de la aparición de la degradación HMWF de forma difusa.

4. La inhibición de las HDAC en células de glioma provoca daño al DNA, en cierta medida como consecuencia de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Una de las posibles causas de la activación de la vía mitocondrial es la activación de la respuesta al DNA dañado. El mantenimiento de la integridad genómica de las células implica procesos que detectan y reparan daños en el DNA, y se asocia a procesos que detienen la progresión del ciclo celular hasta que la reparación ha terminado por completo (Hakem, 2008).

La rotura de doble cadena es una lesión grave que puede generar inestabilidad genómica y conducir finalmente a la muerte celular o a la aparición de cáncer (McKinnon and Caldecott, 2007; Jeggo and Löbrich, 2007). Un componente esencial

en la reparación del DNA es la histona H2AX, que es fosforilada rápidamente para formar aglomerados de γ H2AX en los sitios dañados del DNA, creando así un foco donde se acumulan las proteínas de reparación y remodelación de la cromatina (Rogakou *et al.*, 1999). Esta amplificación hace posible detectar los DSB con un anticuerpo específico contra γ H2AX.

Muchos agentes terapéuticos son capaces de inducir, directa o indirectamente, DSB en las células tumorales para activar las rutas de muerte celular (Helleday *et al.*, 2008; Takahashi and Ohnishi, 2005). Como la formación de DSB contribuye tanto a la inestabilidad genómica como a la muerte de las células tumorales, monitorizar la formación de focos γ H2AX en la célula es una forma de determinar la progresión y la efectividad del tratamiento (Sedelnikova and Pilch, 2003; Sedelnikova and Bonner, 2006).

En el presente trabajo hemos visto que SAHA es capaz de inducir la formación de DSB en las células de glioma, con mayor efecto en las líneas U251-MG y LN229, que en las células U87-MG. La mayor sensibilidad de las dos primeras líneas podría deberse a que ambas tienen mutado el gen supresor p53, esencial para inducir la respuesta de la célula ante el DNA dañado y con un papel importante en la apoptosis y en el control del ciclo celular. p53 es capaz de activar las enzimas de reparación del DNA para corregir los daños detectados y también puede detener el ciclo celular en el punto de control G1/S para evitar su replicación en caso de daño. La falta de p53 en las líneas U251-MG y LN229 hace que dependan más del punto de control G2/M para mantener la integridad del genoma. Además, las células U251-MG son deficientes en PTEN, que es un regulador de la reparación por recombinación homóloga mediante la proteína principal Rad51 (McEllin *et al.*, 2010). Así mismo hemos observado que SAHA disminuye la expresión de la proteína de reparación, Rad51, lo cual puede contribuir al aumento en la formación de DSB en el DNA, del mismo modo que se observó en estudios realizados en células tumorales de próstata y pulmón donde se vio que SAHA era capaz de suprimir la expresión de proteínas involucradas en la reparación de los DSB en el DNA inducidos por esta droga, como por ejemplo proteínas de reparación tales como Rad50 y Mre11 (Lee *et al.*, 2010).

El estudio de la implicación de la activación de caspasas en el daño inducido por SAHA revela que la formación de DSB en el DNA no es dependiente de la activación de caspasas puesto que, la adición del inhibidor de caspasas no previene este efecto.

Algunos estudios han observado que el uso de algunos HDACi, en concreto SAHA, pueden inducir un mecanismo de muerte en el cual están involucrados la regulación transcripcional y el corte de Bid, miembro de la familia Bcl-2 que vincula la vía iniciada por receptores de muerte con los eventos mitocondriales de la apoptosis, y un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), relacionándose con un aumento en la formación de DSB, como mecanismo citotóxico de estos agentes (Ruefli *et al.*, 2001). Las especies reactivas de oxígeno están implicadas en un gran número de patologías, incluyendo diabetes y enfermedades neurodegenerativas. Además, un incremento en la producción de ROS es considerado como un mecanismo capaz de dañar el DNA, permitiendo finalmente la activación de las rutas de muerte celular (Lee *et al.*, 2010; Marks, 2010; Jackson and Loeb, 2001). En primer lugar demostramos que el tratamiento con los HDACi promueve un aumento en la producción de ROS, aunque la carbonilación de proteínas no se veía muy afectada (sólo presentaba diferencias significativas en células U87-MG). Estos resultados se correlacionan con estudios recientes que indican que algunos HDACi, por ejemplo Tricostatina (TSA) (Sun *et al.*, 2014) o MS-275 (Rosato *et al.*, 2003), promueven la acumulación de ROS, siendo un factor importante en la muerte de las células tumorales inducida por estos fármacos.

En los últimos años se ha propuesto que los HDACi inducen citotoxicidad sobre las células tumorales, sin afectar a las células normales, debido a un aumento en la producción de ROS (Ungerstedt *et al.*, 2005). En este mecanismo se han involucrado cambios en la expresión de dos proteínas: tioredoxina (TRX) y una proteína de unión a tioredoxina (TBP-2) (Marks, 2009; Butler *et al.*, 2002). Sin embargo, en nuestro modelo de estudio, no observamos cambios en los niveles de expresión de ninguna de las dos proteínas tras los tratamientos con los HDACi descartando así la implicación de una menor actividad de TRX como causa del incremento de ROS.

Finalmente, determinamos que la formación de DSB en el DNA era parcialmente debida la producción de ROS en las líneas U87-MG y U251-MG, puesto que la adición de dos agentes que reducen el estado oxidativo de las células como son el glutatión (GSH) y la N-acetilcisteína (NAC) consiguen reducir parcialmente la producción de daño en el DNA causado por SAHA. Sin embargo, el hecho de que en células LN229 los agentes reductores no bloqueen la formación de DSB nos indica que la producción de ROS no es el único factor implicado en el daño al DNA inducido por los inhibidores de las HDAC. Así pues, tienen que existir otros mecanismos

moleculares alterados como se ha propuesto que podrían ser la maquinaria de reparación del DNA (Robert and Rassool, 2012), la acetilación de histonas involucradas en la reparación del DNA por ejemplo, Histona 3 (Bhaskara *et al.*, 2008) o Histona 4 (Kao *et al.*, 2003); o una disminución de las proteínas involucradas en el punto de control G2 (Guertin *et al.*, 2012).

Nosotros hemos demostrado que SAHA promueve la disminución de la expresión de las quinasas del punto de control G2, Wee1 y Chk1, y también la proteína de reparación Rad51, y aunque no se ha comprobado en este trabajo, probablemente provoque también un incremento en la acetilación de las Histonas 3 y 4. Por lo tanto, los mecanismos implicados en la generación de los DSB inducidos por los HDACi son múltiples, y no es tan sólo atribuible al incremento en la producción de ROS.

5. Los HDACi afectan a la progresión del ciclo celular y disminuyen la expresión de proteínas involucradas en el punto de control G2: Wee1 y Chk1

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de las células de glioma con los HDACi provoca la disminución del porcentaje de células que se encuentran en fase S, mientras que la población de células en fase G2/M se ve aumentada. Estos cambios en el ciclo celular podrían ser debidos bien a una parada del ciclo o bien a una progresión más rápida de la población celular a la fase G2/M. Sin embargo, sólo en células LN229 estos fármacos son capaces de incrementar el porcentaje de células que se encuentran en fase G0/G1. Por lo tanto, la observación de un incremento en la población celular que se encuentran en fase G2/M a expensas de las fases G0/G1 y S, sugiere que existe una alteración del punto de control G2. Además, observamos que los HDACi provocan un aumento del pico sub-G1 tras los tratamientos indicando que ambas drogas promueven la muerte de las células de glioma, como ya habían indicado los ensayos de viabilidad.

Estas alteraciones observadas en la fase G2/M nos llevaron a analizar la expresión de quinasas importantes reguladoras de este punto de control. Una de estas proteínas quinasas reguladoras del punto control G2 en células de glioblastoma es Wee1 (Vriend *et al.*, 2013). Esta proteína juega un papel importante en el control de la progresión del ciclo celular, actuando como reguladora negativa de la entrada en

mitosis en caso de daño en el DNA. Se ha demostrado que Wee1 es una de las proteínas que se encuentran sobre-expresada en diferentes tumores primarios de glioblastoma multiforme y que participa en la elevada resistencia de este tipo de tumores a las terapias anti-tumorales convencionales (Mir *et al.*, 2010). También analizamos la expresión de Chk1 que regula la transición G2/M a través de la inhibición de la fosfatasa cdc25. Nuestros resultados muestran que las células U251-MG tienen mayor expresión de Wee1 y Chk1 que las otras dos líneas de glioma, por lo que, tienen mayor capacidad de evitar que las células entren en mitosis con el DNA dañado, que les podría conducir a la muerte. Esto supone una ventaja para las células tumorales ante la exposición a las terapias anti-tumorales dirigidas a dañar el DNA, por ello, el diseño de fármacos dirigidos contra estas proteínas podría ser una buena diana terapéutica de sensibilización de las células tumorales.

Demostramos que los HDACi provocan una disminución en la expresión de Wee1 y Chk1 correlacionada con una fuerte reducción de la fosforilación de cdc2 en Tyr-15, el residuo diana de Wee1 y cdc25, por lo tanto, disminuye la fosforilación del complejo ciclina B1/cdc2 en un sitio que inhibe su actividad y en consecuencia, este complejo estará activo, promoviendo así la entrada en mitosis. La disminución de la expresión de Wee1 y Chk1 inducida por los HDACi podría ser un factor importante en la sensibilización de las células de glioma ante las terapias anti-tumorales, puesto que se ha descrito que la disminución de los niveles de Wee1 provoca que las células entren de forma prematura en mitosis sin haber completado la reparación del DNA, causando su muerte por catástrofe mitótica (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008). También se correlaciona la disminución de Chk1 con la aparición de células apoptóticas (Brazelle *et al.*, 2010) y con el aumento de la acumulación de DSB en el DNA (Lee *et al.*, 2011), de ahí, la importancia de inhibir tanto Wee1 como Chk1 para superar la resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos.

El hecho de que TMZ no altere la expresión ni de Wee1 ni de Chk1 da soporte a que la resistencia de las células de glioma a este fármaco quimioterapéutico pueda ser debido a la acción de estas dos quinasas ya que, aunque TMZ provoca daño en el DNA, las células pueden parar la progresión en ciclo -en el punto de control G2/M, y el daño producido podrá ser reparado por las células. Hubiese sido interesante realizar el análisis de ciclo celular también con células tratadas con TMZ para comprobar si tiene lugar la parada en G2/M, pero no se incluyó esta condición en el estudio. De todas formas otros grupos han demostrado que las células de glioma se paran en G2/M

cuando son expuestas a TMZ o a radiación ionizante (Mir *et al.*, 2010). Así mismo Mir y colaboradores (2010) han demostrado que la inhibición de Wee1 con el fármaco PD0166285 o su silenciamiento con siRNA potencia los efectos de TMZ y la radiación ionizante sobre las células de glioma U251-MG (Mir *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo en el que observamos una disminución de las proteínas Wee1 y Chk1 tras el tratamiento con los HDACi, está de acuerdo con otro estudio realizado en células tumorales de colon en el que obtienen que la inhibición farmacológica de quinasas involucradas en el punto de control G2 -Wee1 y Chk1, tiene efectos anti-tumorales importantes, causando además DSB en el DNA en ausencia de agentes quimioterapéuticos que dañen el DNA (Guertin *et al.*, 2012). Además, se ha visto que la combinación de terapia con agentes que dañan el DNA e inhiben Wee1 promueve a una entrada prematura en mitosis de las células, causando catástrofe mitótica (De Witt Hamer *et al.*, 2011), y junto con la inhibición de Chk1 se produce la rápida fragmentación cromosómica seguida de muerte de las células de forma independiente a la activación de caspasas (Del Nagro *et al.*, 2014). Todos estos resultados sugieren que los fármacos que inhabilitan el punto de control G2 pueden tener un potencial interesante como terapia anti-tumoral y además, nuestros resultados demuestran que las quinasas involucradas en el punto de control G2 son mediadores moleculares de los efectos de los inhibidores de las HDAC sobre la muerte de las células de glioma.

La pérdida de Wee1 o Chk1 puede provocar un aumento de la actividad cdc, originando un exceso de orígenes de replicación y aumentando la probabilidad de colapso de las horquillas de replicación, causando SSB o DSB en el DNA. Esto indica que la reparación por recombinación homóloga aumenta y también la función del complejo Mus81/Eme1. Por ello, la inhibición de Wee1 causaría un aumento de sustratos para las nucleasas y una acumulación de DSB que obligaría a la célula a morir ó a entrar en senescencia (Sørensen and Syljuåsen, 2012; Beck *et al.*, 2012).

A pesar de que Mus81 es una endonucleasa que puede estar implicada en la formación de DSB tras la inhibición de Wee1 (Domínguez-Kelly *et al.*, 2011) y en células deficientes en Chk1 (Forment *et al.*, 2011), nuestros resultados demuestran que Mus81 no es la endonucleasa responsable de promover la formación de DSB, puesto que la disminución de su expresión con shRNA específicos no bloquea el daño al DNA inducido por SAHA. Además los resultados muestran que Mus81 no es necesaria para la fragmentación final del DNA, puesto que al reducir su expresión no se altera la

fragmentación ni de alto peso molecular ni de bajo peso molecular que causa el tratamiento con SAHA.

6. Los HDACi causan muerte de las células de glioma por catástrofe mitótica

Nuestros resultados demuestran que la activación de la vía intrínseca a pesar de participar en la muerte de las células de glioma, no parece ser la principal responsable. Esto junto con el hecho de que los HDACi reducen la expresión de proteínas involucradas en el punto de control G2, Wee1 y Chk1, plantea la posibilidad de que las células mueran por catástrofe mitótica (Del Nagro *et al.*, 2014; Mir *et al.*, 2010). Esta muerte es debida a una entrada en mitosis sin haber reparado previamente el daño en el DNA, que provocará la muerte de dichas células por apoptosis o necrosis.

Conocemos que el éxito de la división celular requiere una adecuada duplicación y segregación del genoma, mediado por el huso mitótico. El punto de control del huso mitótico es un mecanismo que tienen las células para asegurar la fidelidad de la segregación de los cromosomas durante la mitosis, previniendo así una entrada prematura en anafase. Las proteínas pasajeras cromosomales, entre las que se encuentra survivina, han sido propuestas recientemente como proteínas importantes en la regulación de la mitosis (Vagnarelli and Earnshaw, 2004; Sampath *et al.*, 2004).

La morfología de las células U251-MG en división tras del tratamiento con SAHA muestra que survivina no se recluta en el centrómero, no se observa la correcta formación del huso mitótico y las células presentan morfologías mitóticas aberrantes. A estos resultados tenemos que añadir la observación de que en ninguna de las muestras analizadas llegamos a observar células ni en telofase ni en citocinesis, indicándonos que las células tratadas con esta droga no son capaces de salir de mitosis con normalidad, sugiriendo la muerte de las células de glioma durante la mitosis. Estos datos se correlacionan con una disminución en la expresión de las proteínas survivina y TPX2 tras los tratamientos con los HDACi. Además también observamos que las células tratadas con SAHA entran en metafase con el DNA dañado, correlacionándose con la disminución de las proteínas involucradas en el punto de control G2 (Wee1 y Chk1), por lo que, estas células tumorales entran en mitosis sin poder reparar previamente el daño en el DNA.

Nuestros resultados coinciden con otros estudios en los que se observa que el tratamiento con algunos inhibidores de las HDAC (como TSA, butirato de sodio (NaBu) y hexametilén-bisacetamida (HMBA)) de distintos tipos de células tumorales: cáncer cervical, melanoma, cáncer de mama o cáncer de próstata, entre otros; causa mitosis aberrantes con fallos en la condensación de los cromosomas (Qiu *et al.*, 2000; Robbins *et al.*, 2005), así como también se vio que el tratamiento con algunos HDACi (TSA, SAHA, NaBu, entre otros) retrasa temporalmente la progresión a través de la mitosis debido a una activación del punto de control del huso mitótico y cuando las células son capaces de sobrepasar este punto de control mediante una segregación aberrante, salen de mitosis para llevar a cabo una citocinesis errónea (Stevens *et al.*, 2008). De forma similar, se observó también que el tratamiento con TSA induce un retraso en la transición G2/M, una mala orientación de los polos y el incorrecto alineamiento de los cromosomas, induciendo una mitosis defectiva que provoca la muerte de las células tras una salida defectiva de mitosis (Noh *et al.*, 2009). Por lo tanto, podemos explicar con nuestros resultados estos efectos, ya que hemos observado que los inhibidores de las HDAC reducen de forma significativa la expresión de proteínas cruciales en el punto de control G2, y disminuyen también la expresión de proteínas involucradas en la segregación de los cromosomas, reparación del DNA y en la formación del huso mitótico.

Hemos mostrado que el tratamiento de células de glioma con SAHA y VPA disminuye la expresión de Rad51, proteína involucrada en la reparación del DNA por HR. Esta disminución que las células U251-MG, tratadas con SAHA carezcan de la formación de focos subnucleares de reparación del DNA. Este efecto ya había sido descrito previamente por otros grupos, en el que se observó que un inhibidor de HDAC, PCI-24781, disminuye la expresión de Rad51, inhibiendo la recombinación homóloga (Adimoolam *et al.*, 2007). Sin embargo, no sólo se sabe que los HDACi reducen la expresión de proteínas involucradas en HR, sino que también se ha observado que pueden reducir la expresión de proteínas involucradas en la reparación por recombinación no homóloga (NHEJ) o por escisión de bases (BER) (Robert and Rassool, 2012) en distintos tipos de células tumorales, como por ejemplo Rad50 y Mre11 en células tumorales de próstata y pulmón (Lee *et al.*, 2010); Ku70 y Ku80 y Rad50 en células de melanoma (Munshi *et al.*, 2005); y Rad51 y Brca1 en células tumorales de próstata (Kachhap *et al.*, 2010).

Otra proteína importante que hemos visto disminuida con el tratamiento de los HDACi en células de glioma es survivina. En principio esta proteína se describió como un inhibidor de la apoptosis, sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias de que se trata de una proteína importante en la regulación de la mitosis (Lens *et al.*, 2006). Esto explica el porqué de que se encuentre sobre-expresada en muchos tipos de cáncer y porqué se usa como un factor de pronóstico en varios tipos de cáncer, ya que se relaciona el aumento de su expresión con un peor pronóstico (Duffy *et al.*, 2007). Un estudio con un mutante dominante-negativo de survivina demostró que su sobre-expresión en un modelo xenógrafo de cáncer de colon en ratón, inhibía el crecimiento del tumor porque inducía la muerte celular por catástrofe mitótica y apoptosis, además de inhibir la angiogénesis (Tu *et al.*, 2005). También se ha descrito que la inhibición de survivina resulta en un retraso de la mitosis, induce defectos en el alineamiento de los cromosomas, fallo de la citocinesis y la muerte de las células (Carvalho *et al.*, 2003). Todos estos datos refuerzan el papel fundamental de survivina como mediadora de los efectos inducidos por los HDACi en este estudio.

La catástrofe mitótica es un tipo de muerte acompañada por la condensación de cromatina, liberación de proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria, activación de caspasas y degradación del DNA (Castedo *et al.*, 2004 a). Varias líneas de investigación han demostrado que la activación de la caspasa-2 promueve muerte celular inducida por una mitosis anormal, aunque todavía se desconoce cómo se transduce en su activación (Fava *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2008). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con SAHA de las células de glioma promueve la activación de caspasa-2 y, por lo tanto, refuerza la idea de que las células de glioma tratadas con los HDACi mueren por un mecanismo de catástrofe mitótica que conduce a la activación de caspasas y de la vía mitocondrial.

En resumen, concluimos que la capacidad de los HDACi de inducir muerte de las células de glioma *in vitro*, nos ha sido muy útil para determinar qué dianas moleculares pueden ser interesantes para el desarrollo de terapias más específicas. Los resultados demuestran que los HDACi afectan a la expresión de proteínas involucradas en varios procesos de la tumorigénesis como: el punto de control G2/M del ciclo celular, los mecanismos de reparación del DNA, y proteínas involucradas en la formación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas durante la mitosis, induciendo finalmente muerte por catástrofe mitótica y activación de la apoptosis en las células tumorales.

7. Los cultivos primarios de GBM tratados con SAHA se comportan de forma similar a las líneas celulares de glioma testadas

El análisis de los efectos de los HDACi sobre cultivos primarios de GBM demuestra que los HDACi tienen efectos similares a los observados en las líneas celulares tumorales sobre la expresión de las proteínas clave que hemos incluido en el estudio, independientemente del origen y de sus alteraciones genéticas, validando así los resultados obtenidos en las líneas de glioma. Sin embargo, uno de los cultivos primarios de GBM, identificado como C48, presenta niveles muy bajos de expresión de las proteínas que hemos estudiado por lo que no podemos sacar conclusiones sobre este cultivo primario. Sería interesante analizar la respuesta de estas células al tratamiento con los HDACi para determinar si estos son capaces de inducir su muerte.

Un aspecto a tener en cuenta en el estudio de cáncer es que las alteraciones moleculares que conducen a la tumorigénesis pueden ser muy diversas y totalmente distintas entre tumores de varios pacientes. Además dentro de un mismo tumor se pueden diferenciar subpoblaciones de células con diferentes grados de diferenciación y que, por lo tanto, su respuesta a las terapias difiere mucho. De hecho en GBM, como otros tipos de tumores, se ha identificado una subpoblación de células madre, GSCs, a las que se le atribuye la gran resistencia a los tratamientos anti-tumorales y la capacidad de regenerar el tumor. Sería interesante estudiar el efecto de los HDACi sobre la subpoblación de células madre del tumor para determinar si son sensibles a estos fármacos y evaluar su posible potencial terapéutico.

De los resultados obtenidos en los cultivos primarios de GBM humanos concluimos que los HDACi alteran la expresión de proteínas necesarias en la proliferación y en el mantenimiento de la integridad del genoma celular que son esenciales para la supervivencia y la resistencia a las terapias de las células de glioma.

Parte 2

TRAIL es un miembro de la familia del TNF cuya función principal en condiciones fisiológicas normales es todavía desconocida pero es capaz de inducir apoptosis y activar el factor de transcripción NF- κ B en las células que expresan sus receptores (Kimberley and Screaton, 2004). En los últimos tiempos, el uso de TRAIL recombinante ha surgido como un agente anti-tumoral de gran interés debido a la ausencia de efectos secundarios tras su administración y su capacidad de ser selectivo, dirigiéndose únicamente a células tumorales sin dañar las células normales. Sin embargo, muchos grupos han descrito que el uso de TRAIL por sí solo no es capaz de inducir muerte, ya que algunas células tumorales presentan mecanismos de resistencia (Zhang *et al.*, 1999). En este tipo de tumores, la apoptosis se encuentra por tanto bloqueada debido a alteraciones moleculares en proteínas específicas que regulan ambas vías de la apoptosis, extrínseca e intrínseca.

En el segundo bloque del trabajo nos centramos en analizar si los HDACi incluidos en este estudio eran capaces de sensibilizar a las células de glioma a la muerte inducida por TRAIL.

8. Los HDACi sensibilizan a TRAIL a dos de las líneas celulares de glioma estudiadas, pero son ineficaces para las células U251-MG

En el presente estudio hemos visto que las células de glioma son resistentes a la muerte inducida por TRAIL. Por lo tanto hemos analizado si los inhibidores de las HDAC son capaces de sensibilizar a las células de glioma a este ligando de muerte, como ya se ha determinado en otros tipos de tumores, como las células de cáncer de mama (Frew *et al.*, 2008). Los ensayos de viabilidad han mostrado que en las líneas U87-MG y LN229 los HDACi son capaces de sensibilizar al estímulo de muerte TRAIL, sin embargo no sensibilizan a las células U251-MG. Estudios previos ya habían demostrado que en diferentes líneas celulares de glioma existen distintas sensibilidades a la apoptosis inducida por TRAIL (Rieger *et al.*, 1998).

Un posible motivo de resistencia a la muerte inducida por TRAIL sería el bloqueo de la unión del ligando con el receptor. Esto podría suceder por la ausencia de los receptores de muerte DR4 y/o DR5, por su disfunción debido a mutaciones o bien por la expresión elevada de los receptores señuelo, DcR1 y/o DcR2 (Zhang *et al.*, 2000). Nuestros resultados muestran que las tres líneas de glioma expresan los receptores de muerte DR4 y DR5, aunque la expresión de DR4 es menor en células U251-MG. Con respecto a los receptores señuelo, se sabe que una mayor expresión de cualquiera de estos receptores podría conferir resistencia a TRAIL, sin embargo, hemos obtenido una expresión similar del receptor DcR1 en las tres líneas de glioma, mientras que el receptor DcR2, únicamente se expresa en células U87-MG y U251-MG, siendo mayor en éstas últimas. Por lo tanto, la mayor expresión de DcR2 y la menor expresión de los receptores DR4 y DR5 en células U251-MG podrían contribuir a la resistencia que presentan a la muerte por TRAIL. Un estudio comparativo realizado con 28 líneas celulares de melanoma demuestra una correlación en la expresión de DR4 y DR5 en la superficie celular con la sensibilidad de las células a TRAIL, aunque existen algunas líneas que expresan los receptores pero no responden a TRAIL (Zhang *et al.*, 1999). Otros estudios sugieren que no existe correlación entre la expresión de los receptores de TRAIL y la susceptibilidad de TRAIL a inducir apoptosis en varios tipos de células tumorales como por ejemplo, células de cáncer de mama (Keane *et al.*, 1999), leucemia (Wen *et al.*, 2000) y glioma (Knight *et al.*, 2001), entre otros.

Por otro lado, el análisis comparativo de los componentes principales de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis ha puesto de manifiesto que las células U251-

MG tienen, en comparación con las otras dos líneas celulares de glioma, una expresión muy baja de caspasa-8. Al tratarse de una caspasa iniciadora de la vía extrínseca, si esta proteína no se expresa en suficiente cantidad para promover la activación de la ruta, las células no mueren y por tanto son resistentes a este mecanismo de muerte. Este mecanismo de resistencia a la apoptosis también se ha descrito anteriormente para la línea de glioma U373-MG en la que demuestran el papel esencial de caspasa-8 para mediar la apoptosis inducida por TRAIL (Knight *et al.*, 2001; Juo *et al.*, 1998) y para mediar la respuesta a FasL en linfocitos T Jurkat (Juo *et al.*, 1998). Hemos visto que la expresión ectópica de caspasa-8 en células U251-MG provoca la sensibilización de las células de glioma al tratamiento combinado con TRAIL y SAHA. TRAIL por sí solo promueve una disminución significativa en la viabilidad en células que sobre-expresan caspasa-8, sin embargo no llegamos a detectar el corte proteolítico de caspasas -8, -9 y -3, probablemente debido a problemas de sensibilidad del ensayo de western blot y porque la vía es activada en un porcentaje bajo de la población celular. Nuestros resultados difieren de los observados por Knight y sus colaboradores (2001) puesto que ellos observan que la expresión ectópica de caspasa-8 promueve una gran sensibilización de células de glioma a la apoptosis mediada tanto por FasL como por TRAIL. Además estudios recientes han demostrado que la metilación del gen de caspasa-8 como mecanismo de los bajos niveles de expresión de esta proteína en células malignas de neuroblastoma es la responsable de conferir resistencia a la muerte por apoptosis (Hopkins-donaldson *et al.*, 2000). Knight (2001) sugiere que la resistencia de las células de glioma a la muerte por TRAIL sería debida o bien a un componente mutado o a la expresión de un inhibidor con larga vida media.

En los experimentos de sobre-expresión de caspasa-8 en las células U251-MG hemos visto que a pesar de utilizar un vector lentiviral, los niveles de expresión de la proteína incrementan muy poco. Esta observación nos llevo a comprobar la validez del vector en otra línea celular, las células HEK293, en las que se observa un mayor incremento de la banda de proteína por western blot. Estos resultados sugieren que la disminución de caspasa-8 en la línea de glioma U251-MG podría ser debida a la expresión de un microRNA que regule la traducción de la proteína (Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Las células U87-MG y LN229, a pesar de ser bastante resistentes a TRAIL, presentan una respuesta por activación de caspasas frente a la adición de TRAIL, que se ve incrementada con el tratamiento combinado con los HDACi. Estos resultados se

correlacionan con los obtenidos en los ensayos de viabilidad WST-1, en los cuales TRAIL no inducía muerte masiva, pero sí en combinación con los HDACi.

La presencia de proteínas intracelulares anti-apoptóticas que interfieren con la señalización es otro mecanismo importante para la resistencia de las líneas celulares tumorales. Una forma dominante negativa de caspasa-8 es c-FLIP, que carece de actividad proteolítica. Los niveles de c-FLIP_L se han relacionado con la resistencia a apoptosis inducida por TRAIL en células de melanoma (Griffith *et al.*, 1998; Venza *et al.*, 2014) y en varios tipos de tumores (Safa, 2012; Kim *et al.*, 2000). Se sabe que caspasa-8 procesa la isoforma c-FLIP_L en c-p43-FLIP e induce el reclutamiento de una molécula adaptadora, TRAF2, a c-p43-FLIP que promueve finalmente la activación de la ruta NF-κB (Kataoka and Tschopp, 2004). Nuestros resultados muestran que la isoforma c-FLIP_L no es detectable en ninguna de las tres líneas de glioma, mientras que la c-p43-FLIP se expresa en las tres líneas. Puesto que la expresión de c-FLIP no es muy alta en ninguno de los casos, descartamos esta proteína como responsable de la resistencia de las células de glioma a TRAIL. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de Knight y colaboradores, que no detectaron expresión de las isoformas de c-FLIP en diversas líneas celulares de glioma (Knight *et al.*, 2001).

Dentro de la vía apoptótica se encuentra la familia de proteínas Bcl-2 implicada en la regulación de la vía intrínseca (Gross *et al.*, 1999). Esta familia está formada por miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L y Bag1) y pro-apoptóticos (Bax, Bad, Bak). Hemos observado una menor expresión en células U251-MG de proteínas pro-apoptóticas, Bax y Bad, y también de Bid (nexo de unión entre la ruta extrínseca e intrínseca) lo cual también puede contribuir a la resistencia de estas células a cualquier estímulo de muerte. Por otro lado, el hecho de que las células U251-MG y LN229 expresen altos niveles de Bcl-X_L y las células U87-MG lo hagan con Bcl-2 podrían ser factores importantes en la resistencia a la muerte por TRAIL en las tres líneas de glioma. Estos resultados se correlacionan con estudios realizados en células de glioma en los cuales observan una correlación entre los altos niveles de expresión de Bcl-X_L y la resistencia que tienen estas células a la muerte inducida por un agente alquilante, *cis-diamminedichloroplatinum* (CDDP) (Nagane *et al.*, 1998). Nagane y sus colaboradores (1998) observan que el uso de CDDP sensibiliza a las células de glioma mediante una disminución de la expresión de Bcl-X_L. Hemos observado que el tratamiento con los HDACi sensibiliza a las células U87-MG y LN229 a TRAIL, sin embargo, no lo podemos atribuir a cambios en la expresión de los componentes principales de esta ruta,

ya que los HDACi no inducen variaciones en los niveles de expresión ni de las procaspasas ni de las proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2.

Por último los datos obtenidos para Bid muestran que únicamente en células U87-MG y LN229 hay una pequeña disminución de la banda con el tratamiento combinado de SAHA más TRAIL, que podría relacionarse con su activación, aunque no se llega a observar el fragmento de Bid producto del procesamiento proteolítico. Por lo tanto, en ambas líneas la activación de la vía extrínseca se puede extender a través de Bid a la vía intrínseca, amplificando así la señal de muerte. Puesto que el tratamiento con los HDACi induce la vía intrínseca por sí solo, parece que el efecto que observamos de la combinación de HDACi con TRAIL provenga de la convergencia de la vía extrínseca y la intrínseca a nivel mitocondrial y, por lo tanto, los efectos observados sobre la viabilidad celular son más bien aditivos que sinérgicos.

En resumen y puesto que el tratamiento individual con TRAIL no promueve la muerte de un elevado porcentaje de la población de células de glioma, descartamos la utilidad de esta droga como terapia anti-tumoral en este tipo de tumor. Además los inhibidores de las HDAC no tienen efecto sinérgico al combinarlos con TRAIL, puesto que no producen grandes cambios en la expresión de los componentes de la vía. De hecho los HDACi producen mayor citotoxicidad por sí solos y conducen a las células de glioma a muerte por catástrofe mitótica mediante la activación de la apoptosis, como hemos demostrado en la primera parte del estudio. Nuestros resultados indican que las estrategias de activación de la vía extrínseca no tienen potencial terapéutico para el tratamiento de GBM.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ❖ **Primera.** Los inhibidores de las HDAC, VPA y SAHA, disminuyen la viabilidad y la capacidad proliferativa y de formar clones *in vitro* de las tres líneas de glioma, U87-MG, U251-MG y LN229.
- ❖ **Segunda.** El tratamiento con los HDACi promueve la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en células de glioma, con la activación de caspasa-9 y caspasa-3.
- ❖ **Tercera.** Los HDACi promueven la fragmentación del DNA en células de glioma, dependiente de la activación de caspasas y de la endonucleasa CAD.
- ❖ **Cuarta.** Los inhibidores de las HDAC en células de glioma provocan cortes de doble cadena en el DNA (DSB), debido en parte a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la alteración de los mecanismos de reparación (Rad51).
- ❖ **Quinta.** Los HDACi disminuyen la expresión de proteínas quinasas reguladoras del punto de control G2, Wee1 y Chk1, causando alteraciones en el ciclo celular y la entrada en mitosis con el DNA dañado.
- ❖ **Sexta.** Los HDACi inducen la muerte de las células de glioma por catástrofe mitótica, mediada por la activación de caspasa-2.
- ❖ **Séptima.** SAHA causa los mismos cambios en la expresión de las proteínas Wee1, Chk1, survivina y TPX2 en cultivos primarios de GBM que los observados en las tres líneas celulares de glioma.
- ❖ **Octava.** Los HDACi sensibilizan a las células de glioma U87-MG y LN229 a la muerte inducida por TRAIL.

- ❖ **Novena.** Las células U251-MG son resistentes al ligando de muerte TRAIL debido a una baja expresión de la caspasa iniciadora, caspasa-8.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abràmoff MD, Hospitals I, Magalhães PJ, and Abràmoff M. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11**: 36–42.

Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, and Buggy JJ. (2007). HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19482–7.

Aguirre-Portolés C, Bird AW, Hyman A, Cañamero M, Pérez de Castro I, and Malumbres M. (2012). Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. *Cancer Res.* **72**: 1518–28.

Alexander BM, Pinnell N, Wen PY, and D’Andrea A. (2012). Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma. *J. Neurooncol.* **107**: 463–77.

Altieri DC. (2006). The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 609–15.

Aparicio T, Baer R, and Gautier J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst).*

Asteriti IA, Rensen WM, Lindon C, Lavia P, and Guarguaglini G. (2010). The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? *Biochim. Biophys. Acta* **1806**: 230–9.

Van Attikum H. (2005). ATP-Dependent Chromatin Remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **4**: 1011–1014.

Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, Wen J, Davidoff a, Fukuzawa M, *et al.* (2001). The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* **36**: 1785–91.

Banerjee T, and Chakravarti D. (2011). A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 4858–73.

Baxevanis a D, and Landsman D. (1996). Histone Sequence Database: a compilation of highly-conserved nucleoprotein sequences. *Nucleic Acids Res.* **24**: 245–7.

Beck H, Nähse-Kumpf V, Larsen MSY, O’Hanlon K a, Patzke S, Holmberg C, *et al.* (2012). Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of replication initiation and nucleotide consumption. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 4226–36.

- Behrend L, Henderson G, and Zwacka RM. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 1441–1444.
- Beier D, Schulz JB, and Beier CP. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Mol. Cancer* **10**: 128.
- Bernhard D, Ausserlechner MJ, Tonko M, Löffler M, Hartmann BL, Csordas a, *et al.* (1999). Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB J.* **13**: 1991–2001.
- Bertrand P. (2010). Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **45**: 2095–116.
- Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, Knutson SK, Cortez D, Sun Z-W, *et al.* (2008). Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol. Cell* **30**: 61–72.
- Billen LP, Shamas-Din a, and Andrews DW. (2008). Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S93–104.
- Bolden JE, Peart MJ, and Johnstone RW. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**: 769–84.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, *et al.* (2008). γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 957–967.
- Borden EC, Kluger H, and Crowley J. (2008). Apoptosis : a clinical perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**: 959.
- Bots M, and Johnstone RW. (2009). Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **15**: 3970–7.
- Bouchier-Hayes L, and Green DR. (2012). Caspase-2: the orphan caspase. *Cell Death Differ.* **19**: 51–7.
- Brazelle W, Krehling JM, Gemmer J, Ma Y, Cress WD, Haura E, *et al.* (2010). Histone deacetylase inhibitors downregulate checkpoint kinase 1 expression to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* **5**: e14335.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, and Wang X. (1999). Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annu. Rev. cell Div. Biol.* **15**: 269–90.
- Burgess A, Ruefli A, Beamish H, Warrener R, Saunders N, Johnstone R, *et al.* (2004). Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene* **23**: 6693–701.
- Butler LM, Zhou X, Xu W-S, Scher HI, Rifkind R a, Marks P a, *et al.* (2002). The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 11700–5.

- Carrier F, and Greenebaum S. (2013). Chromatin Modulation by Histone Deacetylase Inhibitors : Impact on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation. **5**: 51–59.
- Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, Harris LN, and Szallasi Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.* **38**: 1043–8.
- Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, and Wheatley SP. (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* **116**: 2987–98.
- Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, and Kroemer G. (2004).(a). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**: 2825–37.
- Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, *et al.* (2004).(b). Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* **23**: 4362–70.
- Chen M-Y, Liao WS-L, Lu Z, Bornmann WG, Hennessey V, Washington MN, *et al.* (2011). Decitabine and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibit growth of ovarian cancer cell lines and xenografts while inducing expression of imprinted tumor suppressor genes, apoptosis, G2/M arrest, and autophagy. *Cancer* **117**: 4424–38.
- Chen XB, Melchionna R, Denis CM, Gaillard PH, Blasina a, Van de Weyer I, *et al.* (2001). Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Mol. Cell* **8**: 1117–27.
- Chowdhury D, Keogh M-C, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, and Lieberman J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* **20**: 801–9.
- Chowdhury D, Xu X, Zhong X, Ahmed F, Zhong J, and Ma B. (2011). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates γ -H2AX generated during DNA replication. **31**: 33–46.
- Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**: 1–16.
- Compton MM. (1992). A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev.* **11**: 105–19.
- Costelloe T, Fitzgerald J, Murphy NJ, Flaus A, and Lowndes NF. (2006). Chromatin modulation and the DNA damage response. *Exp. Cell Res.* **312**: 2677–86.
- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu S-W, *et al.* (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* **158**: 507–17.
- Deckbar D, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, Walker S, *et al.* (2007). Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* **176**: 749–55.

- Dehé P-M, Coulon S, Scaglione S, Shanahan P, Takedachi A, Wohlschlegel J a, *et al.* (2013). Regulation of Mus81-Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**: 598–603.
- Delcuve GP, Khan DH, and Davie JR. (2012). Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin. Epigenetics* **4**: 5.
- Dickinson M, Johnstone RW, and Prince HM. (2010). Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect. *Invest. New Drugs* **28 Suppl 1**: S3–20.
- Domínguez-Kelly R, Martín Y, Koundrioukoff S, Tanenbaum ME, Smits V a J, Medema RH, *et al.* (2011). Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J. Cell Biol.* **194**: 567–79.
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47–95.
- Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, and Ryan BM. (2007). Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett.* **249**: 49–60.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**: 495–516.
- Erenpreisa J, Kalejs M, and Cragg MS. (2005). Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. *Cell Biol. Int.* **29**: 1012–8.
- Errami Y, Naura AS, Kim H, Ju J, Suzuki Y, El-Bahrawy AH, *et al.* (2013). Apoptotic DNA fragmentation may be a cooperative activity between caspase-activated deoxyribonuclease and the poly(ADP-ribose) polymerase-regulated DNAS1L3, an endoplasmic reticulum-localized endonuclease that translocates to the nucleus during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **288**: 3460–8.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, and Herman JG. (1999). Inactivation of the DNA Repair Gene O 6 - Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia Advances in Brief Inactivation of the DNA Repair Gene O 6 - Methylguanine-DNA Methyltransferase by Prom. *Cancer Res.:* 793–797.
- Eyüpoglu IY, Hahnen E, Buslei R, Siebzehnrübl F a, Savaskan NE, Lüders M, *et al.* (2005). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo. *J. Neurochem.* **93**: 992–9.
- Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, and Liang J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **37**: 719–727.
- Fava LL, Bock FJ, Geley S, and Villunger A. (2012). Caspase-2 at a glance. *J. Cell Sci.* **125**: 5911–5.

- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, and De Laurenzi V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany, NY)*. **4**: 330–49.
- Filén S, and Lahesmaa R. (2010). GIMAP Proteins in T-Lymphocytes. *J. Signal Transduct.* **2010**: 268589.
- Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, *et al.* (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 6048–53.
- Flatmark K, Nome R V, Folkvord S, Bratland A, Rasmussen H, Ellefsen MS, *et al.* (2006). Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiat. Oncol.* **1**: 25.
- Fleury C, Mignotte B, and Vayssière J-L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**: 131–41.
- Forment J V, Blasius M, Guerini I, and Jackson SP. (2011). Structure-specific DNA endonuclease Mus81/Eme1 generates DNA damage caused by Chk1 inactivation. *PLoS One* **6**: e23517.
- Frew AJ, Johnstone RW, and Bolden JE. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett.* **280**: 125–33.
- Frew AJ, Lindemann RK, Martin BP, Clarke CJP, Sharkey J, Anthony D a, *et al.* (2008). Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 11317–22.
- Friedman HS, Kerby T, and Calvert H. (2000). Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clin. cancer Res.:* 2585–2597.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, *et al.* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **21**: 2683–710.
- Galluzzi L, Kepp O, and Kroemer G. (2011). FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis. *Cell Res.* **21**: 1383–5.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**: 107–20.
- Gao H, Chen X, and MCGowan CH. (2003). Mus81 Endonuclease Localizes to Nucleoli and to Regions of DNA Damage in Human S-phase Cells. *Mol. Biol. Cell* **14**: 4826–4834.
- Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, *et al.* (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **166**: 179–91.

- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, *et al.* (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* **138**: 867–73.
- Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-barbat J, and Lopez BS. (2012). Initiation of DNA double strand break repair : signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination , non-homologous end-joining and alternative end-joining. **2**: 249–268.
- Griffith TS, Chin W a, Jackson GC, Lynch DH, and Kubin MZ. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* **161**: 2833–40.
- Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**: 1899–1911.
- Guertin AD, Martin MM, Roberts B, Hurd M, Qu X, Miselis NR, *et al.* (2012). Unique functions of CHK1 and WEE1 underlie synergistic anti-tumor activity upon pharmacologic inhibition. *Cancer Cell Int.* **12**: 45.
- Haar CP, Hebbar P, Wallace GC, Das A, Vandergrift W a, Smith J a, *et al.* (2012). Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochem. Res.* **37**: 1192–200.
- Haefner M. (2008). Experimental treatment of pancreatic cancer with two novel histone deacetylase inhibitors. *World J. Gastroenterol.* **14**: 3681.
- Hakem R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* **27**: 589–605.
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, *et al.* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**: 997–1003.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, and Thompson CB. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **91**: 627–37.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, and Sharma R a. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 193–204.
- Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770–6.
- Hideki S, Masato E, and Shigekazu N. (1999). Functional Differences of Two Forms of the Inhibitor of Caspase-activated DNase , ICAD-L , and ICAD-S. *J. Biol. Chem.* **274**: 15740–15744.
- Higuchi Y. (2003). Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 1527–1535.

- Ho LH, Read SH, Dorstyn L, Lambrusco L, and Kumar S. (2008). Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. *Oncogene* **27**: 3393–404.
- Honda R, Ko R, Nigg EA, and Synchronization C. (2003). Exploring the Functional Interactions between Aurora B , INCENP , and Survivin in Mitosis. *Mol. Biol. Cell* **14**: 3325–3341.
- Hopkins-donaldson S, Bodmer J, Bourlout KB, Apoptosis AL, and Brognara CB. (2000). Loss of Caspase-8 Expression in Highly Malignant Human Neuroblastoma Cells Correlates with Resistance to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis. *Cancer Res.* **60**: 4315–4319.
- Huang L, and Pardee a B. (2000). Suberoylanilide hydroxamic acid as a potential therapeutic agent for human breast cancer treatment. *Mol. Med.* **6**: 849–66.
- Huang Z, Cheng L, Guryanova O a, Wu Q, and Bao S. (2010). Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* **1**: 638–55.
- Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñon E, Gabernet G, García-Belinchón M, Sánchez-Osuna M, Casanelles E, *et al.* (2012). Apoptotic DNA degradation into oligonucleosomal fragments, but not apoptotic nuclear morphology, relies on a cytosolic pool of DFF40/CAD endonuclease. *J. Biol. Chem.* **287**: 7766–79.
- Jabs T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* **57**: 231–45.
- Jackson a L, and Loeb L a. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* **477**: 7–21.
- Jacobson MD. (1997). Programmed cell death: a missing link is found. *Trends Cell Biol.* **7**: 467–9.
- Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Susin SA, and Kroemer G. (1999). Mitochondrial membrane permeabilization during the Apoptotic Process. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **887**: 18–30.
- Jeggo P a, and Löbrich M. (2007). DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* **26**: 7717–9.
- Jiang J, Casalegno-Garduno R, Chen H, Schmitt A, Schmitt M, and Maxwell C a. (2010). Multifunctional proteins bridge mitosis with motility and cancer with inflammation and arthritis. *ScientificWorldJournal.* **10**: 1244–57.
- Johnstone RW, Frew AJ, and Smyth MJ. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 782–98.
- Johnstone RW. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**: 287–99.

Juo P, Kuo CJ, Yuan J, and Blenis J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* **8**: 1001–8.

Kachhap SK, Rosmus N, Collis SJ, Kortenhorst MSQ, Wissing MD, Hedayati M, *et al.* (2010). Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One* **5**: e11208.

Kai M, Boddy MN, Russell P, and Wang TS. (2005). Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. : 919–932.

Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, *et al.* (2009). Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin. Med. Oncol.* **3**: 39–52.

Kanzawa T, Bedwell J, Kondo Y, Kondo S, and Germano IM. (2003). Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J. Neurosurg.* **99**: 1047–52.

Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, Muschel RJ, Lazar M a, and Yen TJ. (2003). Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J. Cell Biol.* **160**: 1017–27.

Kataoka T and Tschopp J (2004). N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase-8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol. Cell Bio.* **24**:2627-36.

Kawabe T. (2004). G 2 checkpoint abrogators as anticancer drugs Minireview G 2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* **3**: 513–519.

Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, and Lipkowitz S. (1999). Chemotherapy Augments TRAIL-induced Apoptosis in Breast Cell Lines. *Cancer res* **59**: 734–741.

Kerr JFR WA and CA. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239–257.

Kim K, Fisher MJ, Xu S, and Cells C. (2000). Molecular Determinants of Response to TRAIL in Killing of Normal and Cancer Cells Advances in Brief Molecular Determinants of Response to TRAIL in Killing of Normal. *Clin. cancer Res.* **6**: 335–346.

Kimberley FC, and Screaton GR. (2004). Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* **14**: 359–72.

Kirkin V, Joos S, and Zörnig M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**: 229–49.

Knight MJ, Riffkin CD, Muscat a M, Ashley DM, and Hawkins CJ. (2001). Analysis of FasL and TRAIL induced apoptosis pathways in glioma cells. *Oncogene* **20**: 5789–98.

- Knizhnik A V, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski K-H, Christmann M, *et al.* (2013). Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* **8**: e55665.
- Kondo Y, and Kondo S. (2006). Autophagy and Cancer Therapy. *Rev. Spotlight Cancer* **2**: 85–90.
- Korsmeyer SJ. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* **80**: 879–86.
- Kroemer G, Galluzzi L, and Brenner C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. review*: 99–163.
- Kusch T, Florens L, Macdonald WH, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR, *et al.* (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**: 2084–7.
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, and Garrido C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* **24**: 5137–48.
- Lee J-H, Choy ML, Ngo L, Foster SS, and Marks P a. (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 14639–44.
- Lee J-H, Choy ML, Ngo L, Venta-Perez G, and Marks P a. (2011). Role of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 19629–34.
- Lens SM a, Vader G, and Medema RH. (2006). The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 616–22.
- Li LY, Luo X, and Wang X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95–9.
- Lindemann RK, Newbold a, Whitecross KF, Cluse L a, Frew a J, Ellis L, *et al.* (2007). Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 8071–6.
- Liu F, Gong J, Huang W, *et al.* (2013). MicroRNA-106b-5p boosts glioma tumorigenesis by targeting multiple suppressor genes. *Oncogene*. 1-10
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, *et al.* (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 8461–6.
- Lord CJ, and Ashworth A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**: 287–94.

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al.* (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**: 97–109.
- Lukas J, Lukas C, and Bartek J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* **13**: 1161–9.
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, *et al.* (2005). Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med. Res. Rev.* **25**: 261–309.
- Mansilla S, Priebe W and Portugal J (2006). Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell cycle.* **5**: 53-60.
- Marks P a. (2010). Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**: 717–25.
- Marks PA. (2009). Thioredoxin in cancer-role of histone deacetylase Inhibitors. *Semin. Cancer Biol.* **16**: 436–443.
- Martin SJ, and Green DR. (1995). Protease Activation during Apoptosis : Death by a Thousand Cuts ? *Cell* **82**: 349–352.
- Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, *et al.* (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis). *J. Biol. Chem.* **270**: 6245–6428.
- Martín Y, Domínguez-Kelly R, and Freire R. (2011). Novel insights into maintaining genomic integrity: Wee1 regulating Mus81/Eme1. *Cell Div.* **6**: 21.
- Masato E, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, and Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis , and its inhibitor ICAD. *Nature* **393**: 43–50.
- Mateen S, Raina K, Jain AK, Agarwal C, Chan D, and Agarwal R. (2012). Epigenetic modifications and p21-cyclin B1 nexus in anticancer effect of histone deacetylase inhibitors in combination with silibinin on non-small cell lung cancer cells. *Epigenetics* **7**: 1161–72.
- McEllin B, Camacho C V., Mukherjee B, Hahm B, Tomimatsu N, Bachoo RM, *et al.* (2010). PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for GBM therapy with temozolomide or PARP inhibitors. *Cancer Res.* **70**: 5457–5464.
- McIlroy D, Tanaka M, Sakahira H, Fukuyama H, Suzuki M, Yamamura K, *et al.* (2000). An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev.* **14**: 549–58.

- McKinnon PJ, and Caldecott KW. (2007). DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **8**: 37–55.
- Mir SE, De Witt Hamer PC, Krawczyk PM, Balaj L, Claes A, Niers JM, *et al.* (2010). In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell* **18**: 244–57.
- Mirzayans R, Andrais B, Scott A, and Murray D. (2012). New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**: 170325.
- Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Flahaut M, Bourlout KB, Nardou K, Joseph J-M, *et al.* (2008). Complex molecular mechanisms cooperate to mediate histone deacetylase inhibitors anti-tumour activity in neuroblastoma cells. *Mol. Cancer* **7**: 55.
- Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, *et al.* (2005). Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin. Cancer Res.* **11**: 4912–22.
- Nabha SM, Mohammad RM, Dandashi MH, Cleavage PAP, Coupaye-gerard B, Aboukameel A, *et al.* (2002). Combretastatin-A4 Prodrug Induces Mitotic Catastrophe in Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Line Independent of Caspase Activation and Poly (ADP-ribose) Polymerase Cleavage. *Clin. cancer Res.* **8**: 2735–2741.
- Nagane M, Levitzki a, Gazit a, Cavenee WK, and Huang HJ. (1998). Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5724–9.
- Del Nagro CJ, Choi J, Xiao Y, Rangell L, Mohan S, Pandita A, *et al.* (2014). Chk1 inhibition in p53-deficient cell lines drives rapid chromosome fragmentation followed by caspase-independent cell death. *Cell Cycle* **13**: 303–14.
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, *et al.* (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263–7.
- Namdar M, Perez G, Ngo L, and Marks P a. (2010). Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 20003–8.
- Noh EJ, Lim D-S, Jeong G, and Lee J-S. (2009). An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G2/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**: 326–31.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, and Zhivotovsky B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913–22.

- Paul T, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, and Bonner WM. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **10**: 886–95.
- Peart MJ, Tainton KM, Ruefli AA, Dear AE, Sedelies KA, Reilly LAO, *et al.* (2003). Novel Mechanisms of Apoptosis Induced by Histone Deacetylase Inhibitors. *Cancer Res.* **63**: 4460–4471.
- Peitsch MC, Müller C, and Tschopp J. (1993). DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4206–9.
- Pérez de Castro I, and Malumbres M. (2012). Mitotic Stress and Chromosomal Instability in Cancer: The Case for TPX2. *Genes Cancer* **3**: 721–30.
- Podhorecka M, Skladanowski A, and Bozko P. (2011). H2AX Phosphorylation : Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. **2011**.
- Polo SE, and Jackson SP. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* **25**: 409–33.
- Portugal J, Mansilla S, and Bataller M. (2010). Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Curr. Pharm. Des.* **16**: 69–78.
- Qiu L, Burgess a, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, and Gabrielli BG. (2000). Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol. Biol. Cell* **11**: 2069–83.
- Regairaz M, Zhang Y-W, Fu H, Agama KK, Tata N, Agrawal S, *et al.* (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J. Cell Biol.* **195**: 739–49.
- Rieger J, Naumann U, Glaser T, Ashkenazi a, and Weller M. (1998). APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS Lett.* **427**: 124–8.
- Robbins AR, Jablonski SA, Yen TJ, Yoda K, Robey R, Bates SE, *et al.* (2005). Inhibitors of Histone Deacetylases Alter Kinetochore Assembly Report ABBREVIATIONS ES KEY WORDS INTRODUCTION RIB. : 717–726.
- Robert C, and Rassool F V. (2012). HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair. 1st ed. Elsevier Inc.
- Robert I, Dantzer F, and Reina-San-Martin B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **206**: 1047–56.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, and Bonner WM. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**: 905–16.
- Rogakou EP. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**: 5858–5868.

- Roos WP, Batista LFZ, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CFM, *et al.* (2007). Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* **26**: 186–97.
- Rosa J, Canovas P, Islam A, Altieri DC, and Doxsey SJ. (2006). Survivin Modulates Microtubule Dynamics and Nucleation throughout the Cell Cycle. *17*: 1483–1493.
- Rosato RR, Almenara JA, Grant S, and Species O. (2003). The Histone Deacetylase Inhibitor MS-275 Promotes Differentiation or Apoptosis in Human Leukemia Cells through a Process Regulated by Generation of Reactive Oxygen Species and Induction of p21 CIP1 / WAF1 1. *Cancer Res.* **63**: 3637–3645.
- Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, *et al.* (2001). 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.
- De Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, and van Kuilenburg ABP. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**: 737–49.
- Safa a R. (2012). c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp. Oncol.* **34**: 176–84.
- Sakahira H, Enari M, and Nagata S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**: 96–9.
- Samejima K, and Earnshaw WC. (2000). Differential localization of ICAD-L and ICAD-S in cells due to removal of a C-terminal NLS from ICAD-L by alternative splicing. *Exp. Cell Res.* **255**: 314–20.
- Samejima K, and Earnshaw WC. (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 677–88.
- Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, and Funabiki H. (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* **118**: 187–202.
- Savill J. (1994). Apoptosis in disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **24**: 715–723.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan a, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, *et al.* (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**: 1675–87.
- Sedelnikova OA, and Bonner WM. (2006). γ H2AX in Cancer Cells. *Cell Cycle* **5**: 2909–2913.
- Sedelnikova OA, and Pilch DR. (2003). Histone H2AX in DNA Damage and Repair. *Cancer Biol. Ther.:* 233–235.

- Shen T, and Huang S. (2012). The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **12**: 631–639.
- Shiokawa D, Ohyama H, Yamada T, and Tanuma S. (1997). Purification and properties of DNase from apoptotic rat thymocytes. **681**: 675–681.
- Singh R, George J, and Shukla Y. (2010). Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. *Cell Div.* **5**: 4.
- Sonnemann J, Hartwig M, Plath A, Saravana Kumar K, Müller C, and Beck JF. (2006). Histone deacetylase inhibitors require caspase activity to induce apoptosis in lung and prostate carcinoma cells. *Cancer Lett.* **232**: 148–60.
- Sørensen CS, and Syljuåsen RG. (2012). Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **40**: 477–86.
- Stevens FE, Beamish H, Warrenner R, and Gabrielli B. (2008). Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage. *Oncogene* **27**: 1345–54.
- Struhl K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**: 599–606.
- Sun S, Han Y, Liu J, Fang Y, Tian Y, Zhou J, *et al.* (2014). Trichostatin A targets the mitochondrial respiratory chain, increasing mitochondrial reactive oxygen species production to trigger apoptosis in human breast cancer cells. *PLoS One* **9**: e91610.
- Susin S a, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441–6.
- Svetlova MP, Solovjeva L V, and Tomilin N V. (2010). Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks. *Mutat. Res.* **685**: 54–60.
- Takahashi A, and Ohnishi T. (2005). Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* **229**: 171–9.
- Tapia-Alveal C, Calonge TM, and O’Connell MJ. (2009). Regulation of chk1. *Cell Div.* **4**: 8.
- Thornberry N a. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science (80-.)*. **281**: 1312–1316.
- Torriglia A, Perani P, Brossas JY, Treton J, Courtois Y, Chaudun E, *et al.* (1998). L-DNase II , a Molecule That Links Proteases and Endonucleases in Apoptosis , Derives from the Ubiquitous Serpin Leukocyte Elastase Inhibitor. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3612–3619.
- Trono D. (2000). HIV-based vectors: getting the best out of the worst. *J. Gene Med.* **2**: 61–3.

- Tu SP, Cui JT, Liston P, Jiang XH, Xu R, Lin MCM, *et al.* (2005). Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology* **128**: 361–375.
- Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu W-S, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, *et al.* (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 673–8.
- Urruticoechea A, Smith IE, and Dowsett M. (2005). Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**: 7212–20.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, and Shiloh Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* **22**: 5612–21.
- Vagnarelli P, and Earnshaw WC. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* **113**: 211–22.
- Vakifahmetoglu H, Olsson M, and Zhivotovsky B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* **15**: 1153–62.
- Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, *et al.* (1998). Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* **438**: 150–8.
- Venza I, Visalli M, Oteri R, Teti D, and Venza M. (2014). Class I-specific histone deacetylase inhibitor MS-275 overrides TRAIL-resistance in melanoma cells by downregulating c-FLIP. *Int. Immunopharmacol.* **21**: 439–46.
- Villano JL, Seery TE, and Bressler LR. (2009). Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**: 647–55.
- Vriend LEM, De Witt Hamer PC, Van Noorden CJF, and Würdinger T. (2013). WEE1 inhibition and genomic instability in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1836**: 227–235.
- Wang K, Liu F, Zhou L, *et al.* (2013). miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell death and disease* **4**: e709
- Wang S, and El-Deiry WS. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **22**: 8628–33.
- Wang XM, Wang X, Li J, and Evers BM. (1998). Effects of 5-azacytidine and butyrate on differentiation and apoptosis of hepatic cancer cell lines. *Ann. Surg.* **227**: 922–31.
- Wei P, Zhang N, Xu Y, Li X, Shi D, Wang Y, *et al.* (2013). TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer. *J. Transl. Med.* **11**: 313.
- Wen J, Ramadevi N, Nguyen D, Perkins C, Worthington E, and Bhalla K. (2000). Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* **96**: 3900–6.

- Widlak P, and Garrard WT. (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J. Cell. Biochem.* **94**: 1078–87.
- De Witt Hamer PC, Mir SE, Noske D, Van Noorden CJF, and Würdinger T. (2011). WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clin. Cancer Res.* **17**: 4200–7.
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, and Oehme I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* **277**: 8–21.
- Wyman C, and Kanaar R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 363–83.
- Yagi Y, Fushida S, Harada S, Kinoshita J, Makino I, Oyama K, *et al.* (2010). Effects of valproic acid on the cell cycle and apoptosis through acetylation of histone and tubulin in a scirrhou gastric cancer cell line. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**: 149.
- Zamzami N, and Kroemer G. (1999). Condensed matter in cell death. *Nature* **401**: 127–8.
- Zhang C, Richon V, Ni X, Talpur R, and Duvic M. (2005). Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 1045–52.
- Zhang J, Liu X, Scherer DC, van Kaer L, Wang X, and Xu M. (1998). Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 12480–5.
- Zhang L, Zhou L, Du J, Li M, Qian C, Cheng Y, *et al.* (2014). Induction of Apoptosis in Human Multiple Myeloma Cell Lines by Ebselen via Enhancing the Endogenous Reactive Oxygen Species Production. *Biomed Res. Int.* **696107**: 1–10.
- Zhang XD, Franco a. V., Nguyen T, Gray CP, and Hersey P. (2000). Differential Localization and Regulation of Death and Decoy Receptors for TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in Human Melanoma Cells. *J. Immunol.* **164**: 3961–3970.
- Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, and Hersey P. (1999). Relation of TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE-inhibitory Protein Expression to TRAIL-induced Apoptosis of Melanoma Relation of TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor and FLICE- inhibitory Protein Expressi. *Cancer re* **59**: 2747–2753.

ANEXO



Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe

M Cornago¹, C Garcia-Alberich¹, N Blasco-Angulo¹, N Vall-Illaura¹, M Nager², J Herreros², JX Comella³, D Sanchis¹ and M Llovera^{*,1}

Glioblastoma multiforme is resistant to conventional anti-tumoral treatments due to its infiltrative nature and capability of relapse; therefore, research efforts focus on characterizing gliomagenesis and identifying molecular targets useful on therapy. New therapeutic strategies are being tested in patients, such as Histone deacetylase inhibitors (HDACi) either alone or in combination with other therapies. Here two HDACi included in clinical trials have been tested, suberanilohydroxamic acid (SAHA) and valproic acid (VPA), to characterize their effects on glioma cell growth *in vitro* and to determine the molecular changes that promote cancer cell death. We found that both HDACi reduce glioma cell viability, proliferation and clonogenicity. They have multiple effects, such as inducing the production of reactive oxygen species (ROS) and activating the mitochondrial apoptotic pathway, nevertheless cell death is not prevented by the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh. Importantly, we found that HDACi alter cell cycle progression by decreasing the expression of G2 checkpoint kinases Wee1 and checkpoint kinase 1 (Chk1). In addition, HDACi reduce the expression of proteins involved in DNA repair (Rad51), mitotic spindle formation (TPX2) and chromosome segregation (Survivin) in glioma cells and in human glioblastoma multiforme primary cultures. Therefore, HDACi treatment causes glioma cell entry into mitosis before DNA damage could be repaired and to the formation of an aberrant mitotic spindle that results in glioma cell death through mitotic catastrophe-induced apoptosis.

Cell Death and Disease (2014) 5, e1435; doi:10.1038/cddis.2014.412; published online 2 October 2014

Glioblastoma multiforme (GBM) is an incurable cancer due to its aggressiveness and its resistance to conventional anti-tumoral therapies. Multiple genetic alterations are involved in gliomagenesis leading to an aberrant activation of key pathways involved in mitogenic signaling and cell cycle control.^{1,2} The intratumoral heterogeneity combined with a putative cancer stem cell subpopulation underlies the difficulty to treat this cancer. The median survival of GBM patients treated with multimodal therapies including surgical resection, radiation and chemotherapy is less than 16 months due to tumor relapse after surgical removal.³

Histone deacetylases (HDAC) are key regulators of cell development and cancer, by deacetylating histones and other proteins.⁴ Recent studies found that class I HDAC expression was high in locally advanced, dedifferentiated and strongly proliferating tumors, sometimes associated with compromised patient prognosis.⁵ In contrast, a reduction in class II HDAC expression was described in different types of tumors, including GBM samples.⁶ Nevertheless, HDAC inhibitors cause the acetylation of both histone and non-histone proteins and exert multiple anti-tumoral effects by inducing differentiation, apoptosis, cell cycle arrest, susceptibility to chemotherapy and inhibition of migration and angiogenesis.⁷

Therefore, HDACi are widely investigated and tested as anticancer drugs. Initial clinical trials indicate that HDAC inhibitors from several structural classes are well tolerated and exhibit therapeutic activity against a variety of human malignancies, and the pleiotropic molecular mechanisms of action of these drugs are being uncovered.^{8–10} The elucidation of the key molecular targets of HDACi involved in glioma cell death is relevant for the development of more specific therapeutic strategies.

Here, we characterize the response of glioma cell lines and primary GBM cultures to two broad range HDACi being tested in clinical trials against GBM: suberanilohydroxamic acid (SAHA, vorinostat) and valproic acid (VPA). Both drugs are able to kill glioma cells more efficiently than the chemotherapeutic drug temozolomide (TMZ). We also present the analysis of the molecular alterations associated with glioma cell death, showing that HDACi drive cells to mitotic catastrophe and cell death by apoptosis.

Results

SAHA and VPA affect glioma cell viability, proliferation and clonogenicity. On WST-1 assays, SAHA and VPA

¹Cell Signaling and Apoptosis Group, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Universitat de Lleida, Lleida, Spain; ²Calcium Signaling and Neuronal Differentiation Group, IRBLleida, Universitat de Lleida, Lleida, Spain and ³Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (VHIR), Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain

*Corresponding author: M Llovera, Cell Signalling and Apoptosis Group, University of Lleida, IRBLleida-UdL, Biomedicina I, 2nd floor b2.13, Rovira Roure, 80, Lleida 25198, Spain. Tel: +34 973702949; E-mail: marta.llovera@cmb.udl.cat

Abbreviations: Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra large protein; CAD, caspase-associated DNase; DSBs, DNA double-strand breaks; GBM, glioblastoma multiforme; GSH, reduced glutathione; γ H2AX, phosphorylated H2AX; HDAC, histone deacetylases; HDACi, histone deacetylase inhibitors; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; SAHA, suberanilohydroxamic acid; ROS, reactive oxygen species; TBP-2, thioredoxin-binding-protein-2; TMZ, temozolomide; TPX2, targeting protein for the *Xenopus* kinesin-like protein 2; VPA, valproic acid

Received 12.5.14; revised 09.8.14; accepted 14.8.14; Edited by A Stephanou

decreased cell viability in a concentration-dependent manner (Figure 1a). Only at intermediate concentrations, differences between glioma cell lines were observed, being U251-MG cells less sensitive than U87-MG cells. LC50 values (Figure 1a) showed that U251-MG has the lower sensitivity to both HDACi. Similar results were obtained by viable cell counting using trypan blue exclusion at selected HDACi concentrations (Figure 1b), being 10 μ M SAHA more effective than 10 mM VPA.

Next, we analyzed the effect of VPA and SAHA on cell proliferation by Ki-67 immunodetection. Treatment with 10 μ M SAHA for 24 h reduced the percentage of proliferating cells

from a range of 70–90% to less than 20% in all cell lines (Figure 1c), whereas 10 mM VPA had a weaker effect and only significant in U251-MG and LN229 cells. Clonogenic assays showed that HDACi reduced significantly the capability of cells to grow clonally after a 48-h treatment, (Figure 1d).

HDACi promote nuclear condensation and the activation of the mitochondrial apoptotic pathway. Our results showed that SAHA and VPA decrease cell viability dose dependently. Therefore, to assess the participation of the apoptotic cell death pathway on this effect, we analyzed the

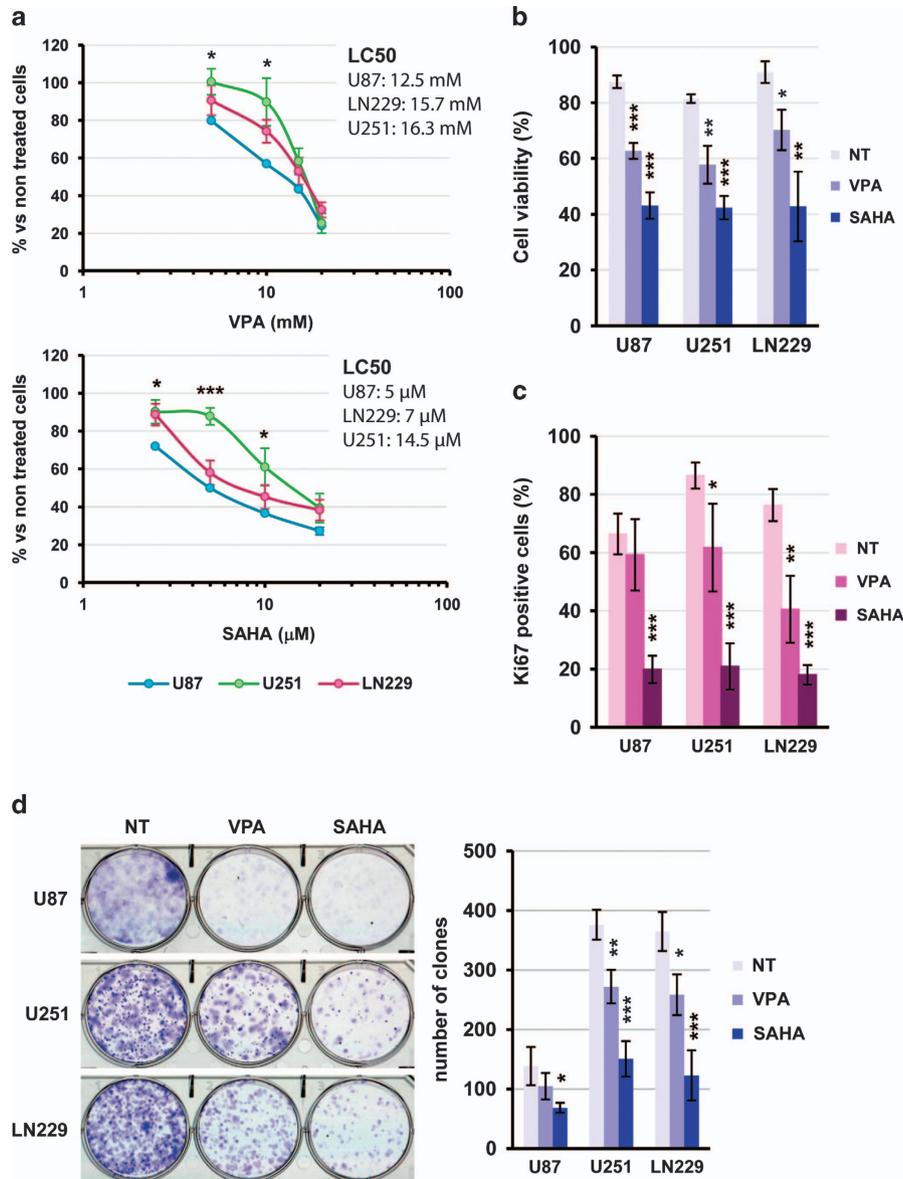


Figure 1 SAHA and VPA reduce glioma cell viability, proliferation and clonogenicity. (a) Dose – response of glioma cell lines U87-MG, U373-MG and LN229 to VPA (upper graph) and SAHA (lower graph) treatment by WST1- cell viability assay. Cells were treated for 48 h with increasing concentrations of HDACi. The LC50 for each cell line was estimated by interpolation in the line-graph. Data shown are mean \pm S.E.M. from five independent experiments. Statistical comparisons were performed against the most sensitive cell line, U87-MG. (b) Cell viability of glioma cell lines after 48- h treatment with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or left untreated. Cells were counted in a hemocytometer by trypan blue exclusion. Data are mean \pm S.E.M. from five independent experiments. (c) Analysis of cell proliferation by Ki-67-positive nuclei counting after 48 h of HDACi treatment (10 mM VPA or 10 μ M SAHA). Data in the graphic are expressed as mean \pm S.E.M. of four independent experiments. (d) Clonogenic assay of glioma cell lines after 48-h treatment with HDACi (see Materials and Methods for details). Representative images of the stained clones are shown on the left. Bar graph shows results obtained from four independent experiments (Mean \pm S.E.M.). Statistical analysis was performed by the Student's *T*-test being **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001

nuclear morphology of glioma cells after 24 h of treatment. As a reference, apoptosis inducer TRAIL was added to cells at 100 ng/ml. Nuclear staining with Hoechst showed that HDACi cause nuclear condensation and abnormal nuclear morphology in some cells (Figure 2a). However, nuclear fragmentation was absent and it was very infrequent in TRAIL-treated cells. Therefore, glioma cells do not show a typical apoptotic nuclear fragmentation after VPA and SAHA treatment. In addition, HDACi induced an increase in nuclear size in U87-MG and LN229 cells, indicating that chromatin was remodeled due to histone acetylation (Supplementary Figure 1).

To determine whether HDACi induced the intrinsic apoptotic pathway, we checked the expression and cleavage of caspase 9 and caspase 3 by western blot (Figure 2b) and executioner

caspase activity by a fluorogenic assay (Figure 2c). We observed that 10 μ M SAHA promoted the cleavage of both Caspase 9 and Caspase 3, whereas 10 mM VPA had a weaker effect in all glioma cell lines. As expected, Caspase-3 cleavage correlated with an increase in the DEVDase activity of SAHA-treated cells (Figure 2c). Therefore, HDACi, mainly SAHA at the concentration tested, are able to promote the activation of the mitochondrial apoptotic pathway in glioma cells. HDACi used in this study did not activate the extrinsic apoptosis pathway on glioma cells (unpublished results).

HDACi promote DNA fragmentation in glioma cells, which is dependent on the activation of the caspase/CAD pathway. Next, we checked whether the activation of

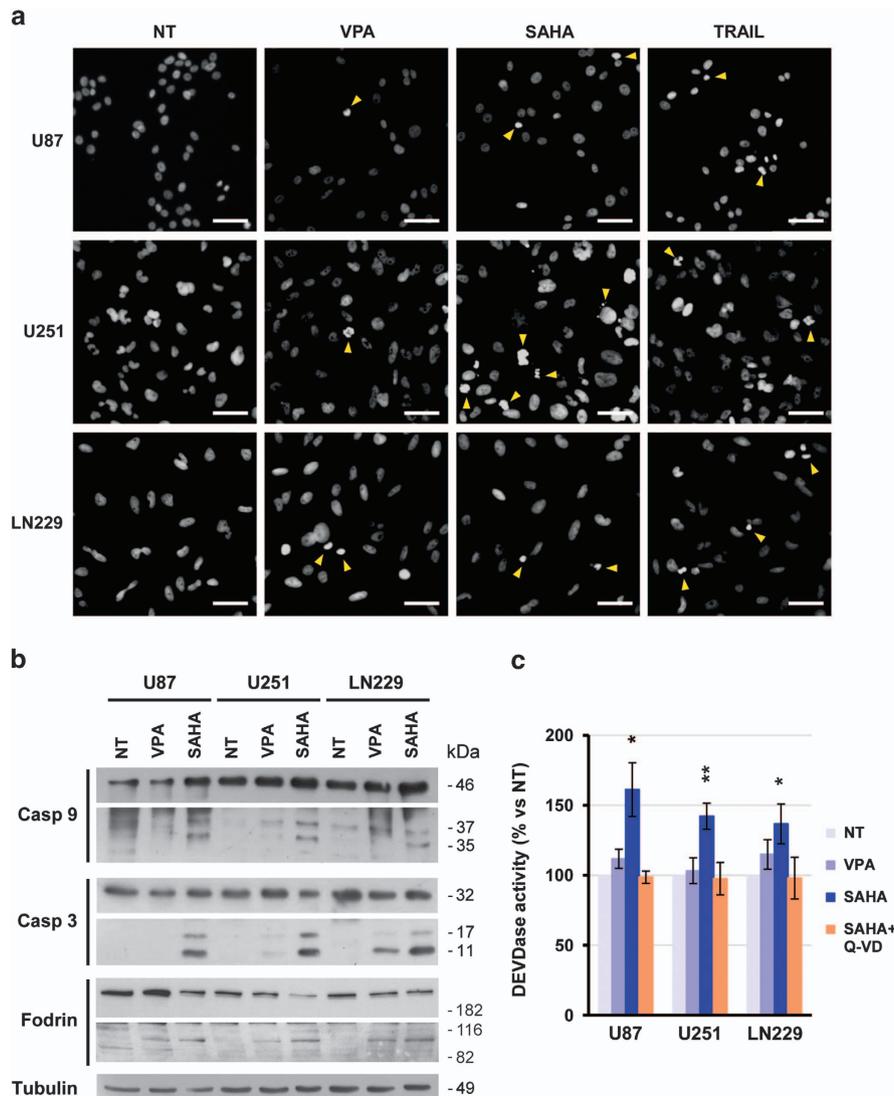


Figure 2 VPA and SAHA induce nuclear condensation and caspase activation in glioma cell lines. (a) Nuclear morphology of U87-MG, U373-MG and LN229 after 24-h treatment with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or 100 ng/ml TRAIL. After treatment, cells were fixed in 4% PFA and nuclei were stained with Hoechst 33342. Condensed and abnormal nuclei are indicated with yellow arrowheads. Scale bar = 50 μ m. (b) Analysis of caspase-9, caspase-3 and fodrin expression and cleavage on glioma cell lines after 24-h treatment with 10 mM VPA and 10 μ M SAHA by western blot. Membrane was reprobbed with an anti- α -tubulin antibody to verify equal loading. A representative blot from three independent experiments is shown. (c) Caspase-3 activity in HDACi-treated cells. Glioma cells were treated with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA alone or in combination with the caspase inhibitor Q-VD-Oph (5 μ M) for 24 h. Cell lysates were incubated with Ac-DEVD-AFC fluorogenic substrate up to 8 h, and its cleavage was measured hourly using a fluorometer. Bars depict mean \pm S.E.M. from four independent experiments. Statistical analysis was performed using the Student's *T*-test by comparing treated versus non-treated (NT) cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

the caspase cascade by HDACi promoted DNA fragmentation. We analyzed DNA integrity by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and agarose gel electrophoresis (Figure 3a). SAHA treatment for 48 h caused the formation of 50- kb DNA fragments and the final DNA degradation in a smear pattern (Figure 3a). Interestingly, the addition of a pan-caspase inhibitor (Q-VD-OPh) blocked both high- and low-molecular weight DNA fragmentation, indicating that caspase activation was necessary for DNA degradation. Staurosporine (STS), an apoptosis inducer, was added for 24 h to U251-MG cells as a positive control for DNA fragmentation. The formation of 50- Kbp DNA fragments was observed, but typical oligonucleosomal laddering was not detected (Figure 3a). These results indicated that U251-MG cells exposed to an apoptosis inducer do not perform DNA internucleosomal fragmentation. To further corroborate the implication of the mitochondrial apoptotic pathway in SAHA-induced DNA degradation, we overexpressed the antiapoptotic gene *BCL-X* in U251-MG glioma cells (Figure 3b). We observed that Bcl-xL-overexpressing cells were protected against the induction of DNA degradation by SAHA, further suggesting the involvement of the intrinsic apoptotic pathway in SAHA effects.

One of the nucleases responsible for DNA processing on caspase activation is Caspase-associated DNase (CAD).¹¹ Therefore, we next verified whether CAD endonuclease was implicated in SAHA effects by using two shRNAs against CAD mRNA that efficiently downregulate CAD protein levels in U251-MG cells (Figure 3d). After SAHA treatment, we observed that CAD downregulation blocked the formation of 50-Kbp and low-molecular weight DNA fragments, leading to bigger DNA fragments showing a smear pattern on the upper part of the gel. This indicates that CAD is the nuclease implicated in the formation of 50-Kbp fragments on HDACi treatment and suggests that 50-Kbp DNA processing is required for the final low-molecular weight DNA degradation. As suggested by the smear pattern that appears in PFGE experiments when CAD expression is reduced (Figure 3c) but not when caspases are inhibited with Q-VD-OPh (Figure 3a) or on Bcl-xL overexpression (Figure 3b), other caspase-activated nucleases may participate in DNA initial processing; however, the identity of this nuclease/s remains to be investigated.

As caspases were involved in DNA fragmentation, we next checked the relevance of caspase activation in HDACi-induced glioma cell death (Figure 3e). Trypan blue exclusion cell counts showed that caspase inhibition did not prevent cell death, indicating that cells died even in the absence of caspase activation, thus indicating that the apoptotic pathway is not required for HDACi-induced glioma cell death.

HDAC inhibition in glioma cells promotes DNA damage partly due to ROS production. One of the mechanisms involved in the activation of the mitochondrial pathway is the activation of the DNA damage response. Therefore, we next verified whether SAHA and VPA were able to promote the formation of DNA double-strand breaks (DSBs). Cells treated with temozolomide (TMZ), an alkylating drug in current use for GBM treatment, were used as positive control (Figure 4a). SAHA and VPA promoted an increase in the percentage of

γ H2AX-positive cells, a marker of DSBs formation, and significant changes in γ H2AX staining for both drugs were attained in U251-MG cells. As expected, TMZ induced a strong increase in γ H2AX-positive nuclei in glioma cells.

As TMZ was more efficient in promoting DNA damage, we next verified the sensitivity of glioma cell lines to this drug. Surprisingly, all three cell lines showed a higher resistance to TMZ than to HDACi used in this study (Figure 4b compared with Figure 1a). In fact, at the maximal concentration of 500 μ M, TMZ did not even reach a 40% decrease in cell viability of the most sensitive cell line U87-MG compared with more than 70% attained by HDACi at the highest doses.

To determine the role of caspase activation in HDACi-induced DNA damage, we next analyzed the effect of caspase inhibition in γ H2AX-positive cells after SAHA treatment (Figure 4c). Results obtained show that caspase inhibition with Q-VD-OPh did not block the formation of DSBs in genomic DNA, indicating that SAHA-induced DNA damage occurs independently of caspase activation.

It has been reported that HDAC inhibition produces an increase in reactive oxygen species (ROS) and that this could contribute to the promotion of DNA damage. We therefore analyzed ROS production in HDACi-treated cells (Figure 4d). Both HDACi tested caused a significant increase in ROS abundance, whereas TMZ did not have this effect. ROS production correlated with an increased protein carbonylation in SAHA-treated U87-MG cells (Supplementary Figure 2A). SAHA-induced ROS generation was blocked by glutathione (GSH) addition (Figure 4d). The mechanism involved in SAHA-induced ROS production in tumoral cells has been proposed to be by the upregulation of thioredoxin-binding-protein-2 (TBP-2) and by the downregulation of thioredoxin activity.¹² We assessed the effect of both HDACi on TBP-2 and thioredoxin protein levels in our cell model, but we did not detect any change neither in TBP-2 nor in thioredoxin expression (Supplementary Figure 2B).

With the aim to determine whether ROS production is involved in HDACi-induced DNA damage, we checked γ H2AX staining on SAHA- and TMZ-treated cells in the presence or absence of ROS inhibitors. We observed that ROS scavenging with 15 mM NAC partially prevented DNA DSBs formation in U87-MG cells and in U251-MG cells, but not in LN229 cells (Figure 4e), pointing out to the existence of an additional molecular alteration that results in DSBs formation in addition to oxidative stress.

HDACi affect cell cycle progression by decreasing G2 checkpoint kinase expression: Wee1 and Chk1. To further characterize glioma cell response to SAHA and VPA, we next analyzed cell cycle distribution by flow cytometry. We observed that, after 24 h, HDACi promoted a significant decrease of U87-MG and LN299 cells in S phase and an increase of cells in G2/M (Figure 5a). Changes on U251-MG cells reached significance after 48h of incubation (data not shown). In addition, an increase of cells in G0/G1 phase was observed in LN229 cells. The reduction of cells in S phase can be due to the promotion of cell cycle arrest or a faster progression to the G2/M phase. However, only LN229 cells showed an arrest in G0/G1. The increase of G2/M-cell population at the expense of G0/G1 and S phases suggests

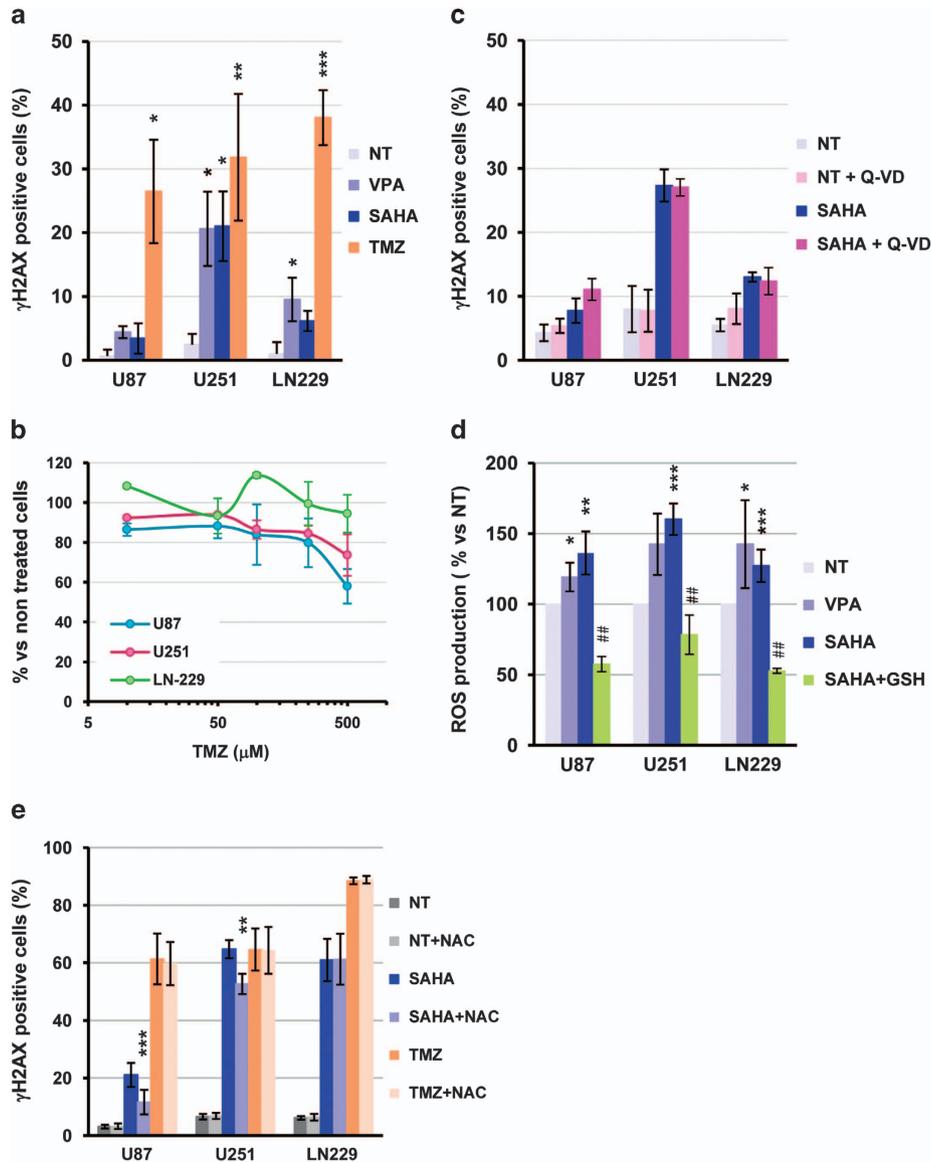


Figure 4 HDACi promote DNA damage by DSBs formation in glioma cell lines. (a) Analysis of DNA DSB formation by immunofluorescence of γ H2AX-positive nuclei in glioma cells treated for 48 h with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or 100 μ M TMZ. Data are mean \pm S.E.M. from five independent experiments. (b) WST-1 cell viability assay on glioma cell lines exposed to increasing concentrations of TMZ (from 10 to 500 μ M) for 48 h. Data shown are mean \pm S.E.M. from three independent experiments. (c) Analysis of γ H2AX-positive nuclei on glioma cells treated with 5 μ M Q-VD-Oph, 10 μ M SAHA or both combined for 48 h. Bars depict mean \pm S.E.M. from four independent experiments. (d) ROS production measured by flow cytometry on glioma cells treated with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or with 10 μ M SAHA in the presence of 10 mM GSH. Data are mean \pm S.E.M. from four independent experiments. (e) Analysis of γ H2AX-positive nuclei on glioma cells treated with 10 μ M SAHA or 100 μ M TMZ in the presence or absence of 15 mM *N*-acetyl-L-cysteine (NAC). Bars depict mean \pm S.E.M. from four independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student's *T*-Test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 in comparison with NT cells or ##*P* < 0.01 in comparison with SAHA-treated cells

an alteration on G2 checkpoint. Interestingly, subG1 peak increased in all glioma cell lines after 48 h of treatment (Supplementary Figure 3). Therefore, we next checked whether SAHA induced apoptosis in glioma cells, using Annexin V-Propidium Iodide (PI) double staining. Data presented on Figure 4e show that SAHA promoted an increase in the percentage of Annexin V-positive cells in the PI-negative population (conserved membrane integrity, left bar-graph), whereas no significant changes were observed in the PI-positive cell population, indicating phosphatidylserine exposure in the cell membrane. These results indicate that SAHA promotes apoptotic cell death in glioma cells.

The accumulation of cells in G2/M prompted us to check whether HDACi affect the expression of G2 checkpoint kinases: Chk1 and Wee1. We observed that 10 μ M SAHA caused a strong decrease in Chk1 and Wee1 protein abundance (Figure 6a), correlating with a decrease in cdc2 phosphorylation on Tyr-15, which is the final effector for M-phase progression and Wee1 substrate. VPA treatment had a weaker effect and also reduced the amount of Chk1 and Wee1 in U87-MG and LN229 cells, respectively. In contrast, the treatment with TMZ, which directly causes DNA damage, did not affect the amount of Chk1 and Wee1 kinases. Interestingly, the more resistant cell line U251-MG

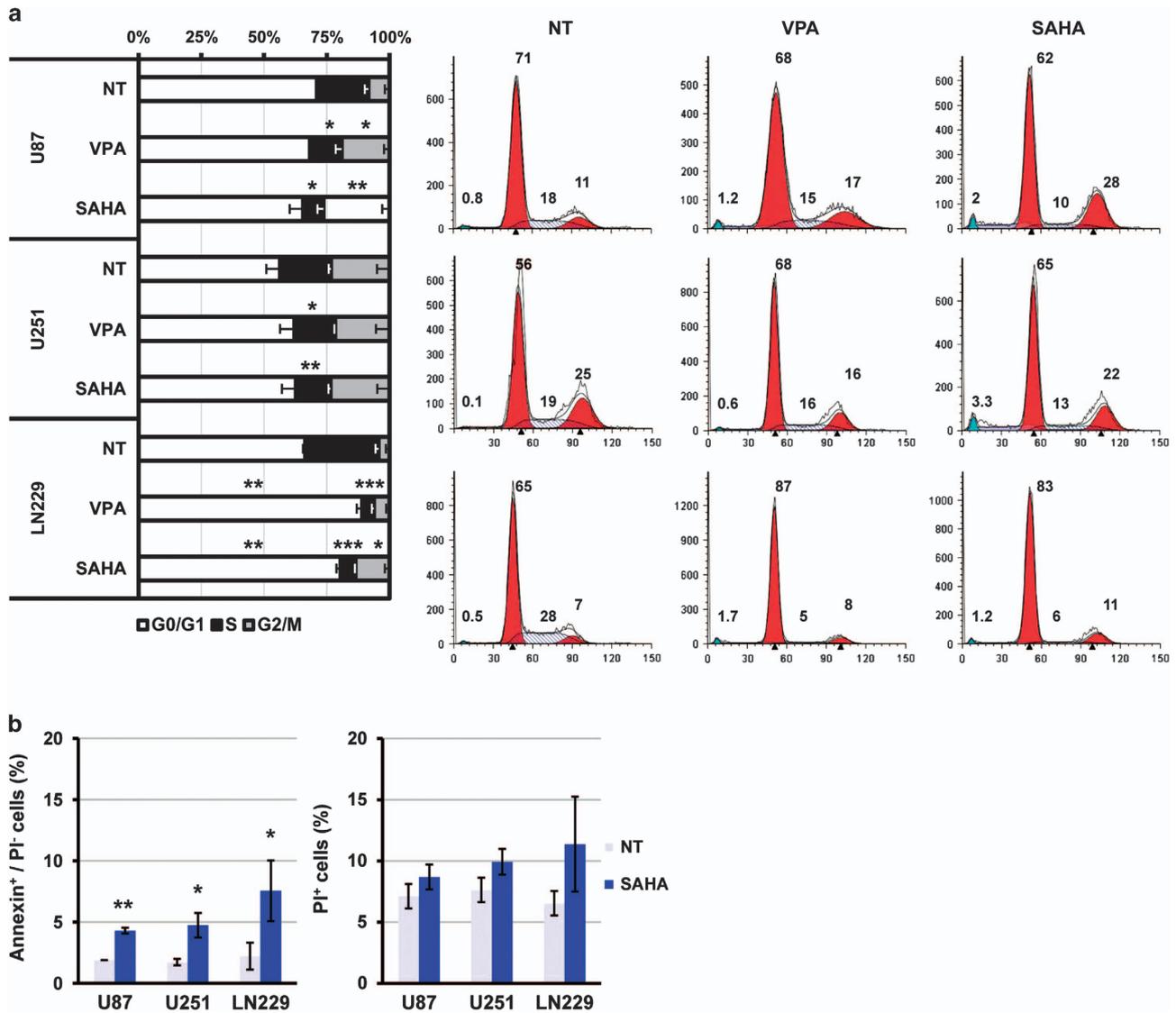


Figure 5 HDACi treatment of glioma cell lines alters cell cycle progression, decreasing the percentage of cells in S phase and increasing cell population in G2/M. (a) Cell cycle analysis by flow cytometry of glioma cell lines treated for 24 h with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or left untreated. Bar graph shows the mean of the percentage of cell in G0/G1, S and G2/M phases with error bars (S.E.M.) from three independent experiments. Plots on the right are representative results from one experiment. (b) Percentage of apoptotic cells (Annexin V positive and PI negative) and dead cells (PI positive) after 24 h of treatment. Results are mean \pm S.E.M. from four independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student's *T*-test and significance is shown by **P* < 0.05; ***P* < 0.01

expresses higher levels of Wee1, followed by LN229 cells and the U87-MG cells. Chk1 was also more expressed in U251-MG and LN229 cells than in U87-MG cells. Results obtained by western blot agreed with Wee1 and Chk1 mRNA levels measured by quantitative real-time RT-PCR (Figure 6b), indicating that HDACi affect Wee1 and Chk1 expression at the transcriptional level.

As the expression of *cdc2* was not affected by HDACi treatment, but the inhibitory phosphorylation on Tyr-15 diminished, we next checked the expression of its cyclin partner (Figure 6a). We observed that cyclin B1 decreased after HDACi treatment and the expression of the cell cycle inhibitor p21 was strongly increased concurring with published data.¹³ In contrast, the amounts of *cdc25A*, a phosphatase involved in the regulation of G1/S and G2/M checkpoints,¹⁴ were unaffected, suggesting that cells were not arrested

through a decrease in *cdc25A*. As *cdc25A* is regulated post-translationally and by subcellular localization, a more detailed characterization of other cell cycle regulators in synchronized cells would be necessary to confirm whether cell cycle arrest occurs on a subpopulation.

Wee1 inhibition has been reported to increase replication stalling and DSBs induced formation by the endonuclease Mus81.^{15,16} Therefore, we checked whether Mus81 is implicated in HDACi-induced DNA damage. As shown in Figure 6c, none of the drugs altered the expression of Mus81. Moreover, Mus81 downregulation by shRNA did not reduce SAHA-induced DSBs formation nor low- and high-molecular weight DNA fragmentation either (Figures 6d and e), discarding the implication of this endonuclease in SAHA DNA-damaging effects.

HDACi cause glioma cell death by promoting mitotic catastrophe. The fact that HDACi cause a decrease in the expression levels of Wee1 and Chk1 made us to hypothesize

that cell death may occur through mitotic catastrophe due to the accumulation of DNA damage that cannot be repaired before mitosis.^{17,18} Therefore, we next analyzed by confocal

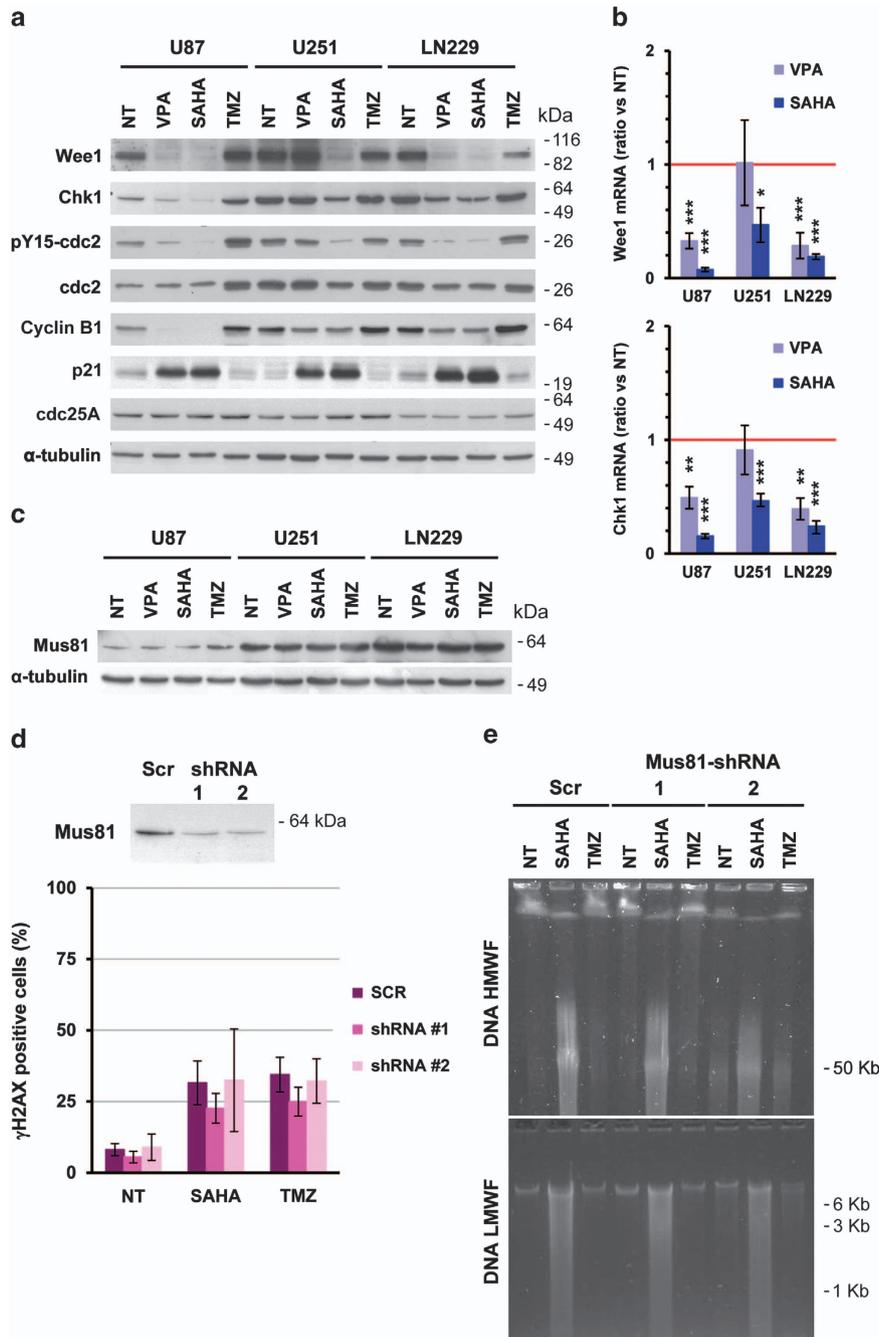


Figure 6 SAHA and VPA reduce the levels of expression of G2 checkpoint gatekeepers Wee1 and Chk1. (a) Analysis of the effect of HDACi on Wee1 and Chk1 protein expression and on the phosphorylation status of cdc2 (Tyr-15) in glioma cells. Cell cycle regulators, Cyclin B1, p21 and cdc25A, were also analyzed. Cells were treated for 24 h with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or 100 μ M TMZ, and protein extracts were analyzed by electrophoresis and western blot using specific antibodies against proteins indicated on the left of the panels. Representative blots of three independent experiments are shown. (b) Analysis of Wee1 and Chk1 mRNA after 24 h of HDACi treatment of glioma cell lines by reverse transcription and quantitative real-time PCR. Bars depict the mean \pm S.E.M. of four independent experiments. (c) Expression of Mus81 endonuclease in glioma cells treated as described above by western blot. Equal loading was verified by α -tubulin detection on the same membrane. (d) Downregulation of the endonuclease Mus81 do not prevent DSBs formation in SAHA-treated U251-MG cells. The efficacy of two specific shRNA against the mRNA of Mus81 (1 and 2) was verified by western blot (upper panel). Percentage of γ H2AX-positive cells after 48 h of incubation in the presence of 10 μ M SAHA or 100 μ M TMZ of lentivirus-transduced cells. Data are mean \pm S.E.M. from three independent experiments. (e) Analysis of DNA fragmentation after Mus81 downregulation with shRNA. Representative gels of three independent experiments are shown, of high-molecular weight DNA fragmentation (upper panel) and low-molecular weight DNA fragmentation (lower panel) analysis

microscopy the nuclear morphology of cells in division after SAHA treatment. Untreated cells had a normal distribution of chromosomes in metaphase, and mitotic spindles were correctly formed (Figure 7a). However, on SAHA treatment dividing cells showed aberrant metaphase morphologies: chromosomes were not aligned at the metaphase plate, Survivin was not recruited to centromeres and an abnormal distribution of mitotic spindle was observed (Figure 7a).

Aberrant mitotic figures were formed, and no cells in telophase or cytokinesis were observed, indicating that cells cannot complete mitosis leading to cell death. In addition we observed that cells enter mitosis with damaged DNA, as chromosomes from SAHA-treated cells were labeled with the γ H2AX antibody (Figure 7a, right image). In addition, HDACi promoted a decrease in the amount of Survivin and TPX2 (Figure 7b), indicating a deficit of proteins relevant for correct

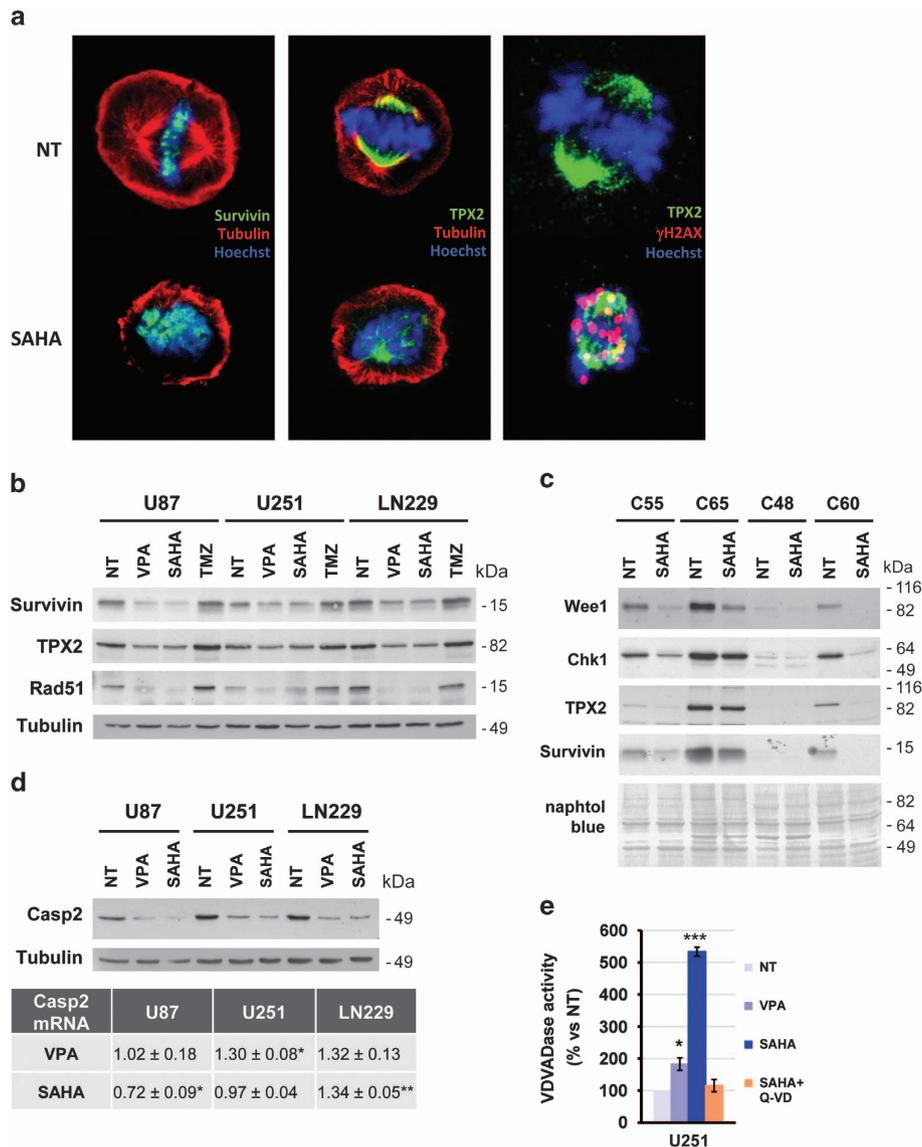


Figure 7 HDACi promote cell death by mitotic catastrophe. (a) Analysis of U251-MG cells in metaphase after SAHA treatment by immunofluorescence of Survivin (in green, left panel) and TPX2 (in green, middle panel), α -tubulin (in red, left and middle panels), γ H2AX (in red, right panel) and nuclear staining with Hoechst 33342 (in blue, all panels). Images were acquired using an Olympus IX-70 confocal microscope and representative pictures from three independent experiments are shown. (b) SAHA and VPA reduce the expression levels of Rad51, Survivin and TPX2 in glioma cell lines. Total cell lysates from glioma cells were analyzed by electrophoresis and western blot using specific antibodies against the proteins indicated on the left. Representative blots from three independent experiments are shown. (c) Analysis of the effect of SAHA on Wee1, Chk1, TPX2 and Survivin protein expression in human GBM primary cultures. Representative blots are shown from three independent experiments. Equal loading was checked by membrane staining with naphtol blue. (d) Caspase 2 protein and mRNA expression in HDACi-treated glioma cell lines. After a 24-h treatment with 10 mM VPA or 10 μ M SAHA, cells were processed for western blot analysis of Caspase-2 (upper panel) or RNA was extracted to perform quantitative RT-PCR (lower table). Data are shown as a ratio versus non-treated cells, and the mean \pm S.E.M. from three independent experiments is summarized. Statistical analysis were performed by the Student's *T*-test being **P* < 0.05; ***P* < 0.01. (e) Caspase-2 activity assay on U251-MG cells treated for 24 h with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA in the presence or absence of 5 μ M Q-VD-Oph. Cell lysates were incubated with Ac-VDVAD-AFC fluorogenic substrate up to 8 h and its cleavage was measured hourly using a fluorometer. Bars depict mean \pm S.E.M. from three independent experiments. Student's *T*-test was performed by comparing data from treated versus non-treated (NT) cells (**P* < 0.05, ****P* < 0.001)

mitosis completion. In addition, we determined the expression of Rad51, a protein involved in homology-directed repair of DNA DSBs. Interestingly, HDACi also reduced the expression levels of Rad51 in glioma cell lines in comparison with untreated cells and TMZ-treated cells (Figure 7a). Therefore, this indicates that HDACi impair DNA repair mechanisms in glioma cells, as it has been described in other types of tumor cells.¹⁹

As HDACi induced a strong decrease of key proteins involved in cell cycle control and mitosis, we verified whether these effects were extensive to primary GBM cultures. Cells isolated from human GBM tumors were treated with 10 μ M SAHA for 24 h (Figure 7c). Three of the four primary GBM cultures reduced the expression of Wee1, Chk1, Survivin and TPX2 after SAHA treatment. Only cells of GBM C48, which expressed very low levels of these proteins in basal conditions, did not show the same response. These results suggest that HDACi have the same molecular effects on glioma cells independently of their origin and genetic alterations, and validate the results obtained in glioma cell lines. Therefore, HDACi alter the expression of proteins necessary for tumoral cell proliferation, which have been previously proven to be involved in gliomagenesis.

Together, these results indicate that glioma cells treated with SAHA die during mitosis by a mechanism involving mitotic catastrophe. One of the initial events that have been reported during this type of cell death is the activation of Caspase-2, upstream of cytochrome c release.²⁰ Therefore, we checked Caspase-2 activation after HDACi treatment (Figure 7d). We observed that HDACi caused a decrease of procaspase-2 (51 kDa) protein, but no cleaved forms were detected (p32 or p18). However, Caspase 2 mRNA levels were unchanged in U251-MG and LN229 cells after HDACi treatment (table in Figure 7d). Measurement of caspase-2 activity in U251-MG cell lysates confirmed that VPA and SAHA promoted the activation of caspase 2, and that Q-VD-OPh addition blocked its activation (Figure 7e). Therefore, our results demonstrate the implication of Caspase 2 in glioma cell death induced by HDACi.

Discussion

Our aim was to characterize the molecular changes induced by broad-range HDAC inhibitors that are used for killing chemotherapy-resistant glioma cells. Here we have demonstrated that two structurally different HDACi, SAHA and VPA, have multiple effects in glioma cancer cells that result in oxidative stress, DNA damage and the activation of the apoptotic mitochondrial pathway. However, the HDACi-induced apoptotic pathway is not the main cause of glioma cell death. Rather, HDACi treatment impairs G2 checkpoint, pushes glioma cells to enter mitosis before DNA damage is repaired and decreases the expression of proteins that have crucial roles in mitosis, thus triggering cell death by mitotic catastrophe.

HDAC inhibition in glioma cell lines causes cell death in a dose-dependent manner, whereas those cells show resistance to the chemotherapeutic agent TMZ. The resistance of GBM cells to chemo- and radiotherapy has recently been attributed to the overexpression of the G2 checkpoint kinase

Wee1.¹⁸ We have shown that HDAC inhibition alters the expression of two G2 checkpoint kinases, Wee1 and Chk1, and results in cells entering mitosis before DNA-damage repair. In accordance with our results, pharmacologic inhibition of G2 checkpoint kinases Wee1 and Chk1 has been shown to have anti-tumoral effects in neuroblastoma cells both *in vitro* and *in vivo*²¹ and cause DNA double-strand breaks in cancer cells in the absence of DNA-damaging chemotherapeutic drugs.²² In addition, Wee1 inhibition sensitizes GBM cells to ionizing radiation and pushes cancer cells onto mitotic catastrophe.¹⁸ In contrast, Chk1 inhibition in combination with a DNA-damaging drug, gemcitabine, drives rapid chromosome fragmentation followed by caspase-independent cell death.¹⁷ In fact, Chk1 has been demonstrated to control mitotic DNA damage checkpoint by delaying mitotic exit of DNA-damaged cells by regulating mitotic catastrophe.²³ The role of Chk1 downregulation in HDACi-induced cell death has been previously demonstrated by Brazelle *et al.*²⁴ in non-small cell lung cancer cells. Nevertheless here we describe for the first time the implication of Wee1 kinase in HDACi effects. Our results demonstrate that G2 checkpoint kinases are molecular mediators of HDACi-induced cell death on GBM cells and highlight the relevance of the administration of multitarget therapies for the treatment of resistant tumors.

Thioredoxin inactivation by the induction of thioredoxin-binding protein (TBP-2) has been previously reported to be important for HDACi-induced ROS production and DNA damage in different cancer cell types.^{10,25,26} However, we have not detected changes in TBP-2 expression, thus discarding this mechanism in our model. In fact, ROS production was implicated in DNA damage observed in U87-MG and U251-MG cells, but not in LN229, indicating that other molecular alterations may participate, such as alteration of the DNA-repair machinery,¹⁹ the acetylation of histones involved in DNA repair such as Histone 4²⁷ or histone 3²⁸ and the decrease in G2 checkpoint kinases.²² Our results show that HDACi display at least two of these effects on glioma cells, as they decrease the expression of G2 checkpoint kinases Wee1 and Chk1 and DNA damage repair protein Rad51. As the endonuclease Mus81 has been implicated in the DNA damage response induced by Wee1 depletion¹⁶ and in Chk1-deficient cells,²⁹ we also checked whether Mus81 was a mediator of DSB formation and DNA fragmentation in SAHA-treated cells. However, our results indicate that Mus81 does not participate in the DNA-damaging effects of SAHA.

HDACi are able to activate the mitochondrial caspase-dependent apoptosis pathway in glioma cells. However, our results indicate that this event does not determine glioma cell death, as caspase inhibition does not prevent it. The detailed analysis of cell cycle distribution and nuclear morphology rather indicates that HDACi promote cell death by mitotic catastrophe due to an aberrant mitotic spindle formation, and the detection of caspase-2 activation supports this conclusion. In accordance with our results, a previous work described that HDACi treatment temporarily delays mitotic progression affecting prometaphase due to activation of the spindle assembly checkpoint, involving aberrant chromosome segregation and failed cytokinesis.³⁰ Similarly, Trichostatin A has been shown to induce a delay at the G2/M transition, chromosome missegregation and multi-nucleation, and

thereby it leads to cell death by promoting exit from aberrant mitosis without spindle checkpoint.³¹ Our results provide an explanation to these observations, as they show that HDACi significantly reduce the expression of G2 gatekeepers Wee1 and Chk1, in addition to other proteins involved in chromosome segregation, DNA repair and mitotic spindle formation. Therefore, HDACi-treated glioma cells die by a mechanism of mitotic catastrophe involving the activation of caspase-2 and the mitochondrial pathway due to DNA-damage accumulation and G2 checkpoint impairment, according to the current concept of mitotic catastrophe.³²

Our results show that the expression of Rad51, a protein involved in DNA repair by homologous recombination, is reduced in HDACi-treated glioma cells. The same effect was described for the HDACi PCI-24781.³³ In fact, it has been reported that SAHA affects the expression of proteins involved in several mechanisms of DNA repair: homologous recombination, non-homologous end joining or base excision repair¹⁹ in different kinds of tumor cells, such as RAD50 and MRE11 in prostate and lung cancer cells,¹⁰ Ku70, Ku80 and RAD50 in melanoma cells³⁴ and Rad51 and BRCA1 in prostate cancer cells.³⁵ HDACi-induced impairment of the DNA repairing potential could explain why antioxidant treatment does not prevent DSB formation in LN229 glioma cells. This implies that HDACi effects on proteins involved in DNA-repair are common and can contribute importantly to DNA damage, in conjunction with ROS production.

Our results also show that Survivin, an antiapoptotic protein that has been shown to be important for the regulation of mitosis,³⁶ is downregulated by HDACi treatment in glioma cells. Survivin is overexpressed in most cancers and it can be used as a prognostic factor for several kinds of tumors.³⁷ Therefore, therapies designed to downregulate or block Survivin have been experimentally tested. A dominant-negative mutant of Survivin significantly induced mitotic catastrophe and apoptosis, and inhibited tumor growth in a colon cancer xenograft model.³⁸ It has also been described that cell division in the absence of Survivin results in defects in chromosome alignment, failure of cytokinesis and eventually cell death.³⁹ Recently, it has been shown that the disruption of the Survivin-Ran complex by a pharmacological inhibitor abolishes survival and growth of glioma stem cells.⁴⁰ Therefore, our findings together with previous data point out to the relevance of Survivin in cancer cell proliferation and support the role of this protein as a mediator of HDACi-induced mitotic catastrophe in glioma cells.

In conclusion, our results show that SAHA and VPA, which are more efficient than the chemotherapeutic drug TMZ in killing glioma cells, reduce the expression of proteins involved in processes relevant for tumor growth and survival: G2/M checkpoint gatekeepers, DNA repair mechanisms and proteins involved in mitotic spindle formation and chromosome segregation during mitosis, thus leading to cell death by mitotic catastrophe. These findings support the view that drugs targeting multiple processes are more efficient in killing cancer cells than DNA-damaging agents.

Materials and Methods

Materials and cell culture. Cell culture media, supplements and sera were from Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Temozolomide (3,4-dihydro-3-

methyl-4-oxoimidazo-[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazine-8-carboxamide, TMZ), valproic acid (VPA), SAHA (suberanilohydroxamic acid, vorinostat), L- reduced glutathione (GSH) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) was acquired from BioTrend Chemikalien GmbH (Köln, Cologne, Germany). Q-VD-OPH was purchased from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Glioma cell lines: U87-MG and U251-MG cells were obtained from CLS Cell Lines Service (Eppelheim, Germany), and LN229 cell line was from ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were maintained in culture as indicated by the supplier at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere and were subcultured by trypsinization twice a week.

Primary cultures: Tumor biopsies were obtained from Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAV; Lleida) and processed following the procedure described by Dr Seoane group.⁴¹

Lentiviral Construction and Transduction. Human *BCL-X* cDNA was cloned into the expression lentiviral vector pEIGW.⁴² Primers for small hairpin RNA interference (shRNA) and control plasmid DNA pLKO.1-puro-SHC002 were bought to Sigma (hMus81-1: TRCN0000049727; hMus81-2: TRCN00000290878). Human *CAD* shRNA were kindly provided by Dr. Victor Yuste (UAB, Barcelona).⁴³ Viruses were prepared and titered as described in Bahi *et al.*⁴⁴ Cells were usually treated after 2–3 days of viral transduction when expression vectors were used or after 4–5 days when shRNA experiments were performed.

WST-1 viability assay. Cell viability was measured using a colorimetric assay with WST-1 reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Glioma cells were seeded in 96-well plates (2–4 × 10³ cells/well), and, after 24 h, cells were treated for 48 h as indicated in the figures. WST-1 reagent was added and absorbance at 450 nm and 600 nm was measured in a BioTek plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) every hour up to 3 h. Cell viability was calculated as percentage of absorbance readings of treated *versus* untreated cultures.

Clonogenic assay. Cells were plated in six-well plates at a density of 3.5–7 × 10⁵ cells/well. Once cells reached 70% confluency, HDACi were added and incubated for 48 h. Afterward, cells were trypsinized, counted by trypan blue exclusion and re-plated (500 cells/well) in duplicate in six-well plates. Cells were grown at 37 °C and 5% CO₂ in normal medium and left to form colonies for 10 days, with a mid-term medium replacement. At the end, cells were fixed with cold-methanol for 10 min and stained with 0.5% crystal violet solution (Sigma) for 10 min at room temperature. Plates were rinsed carefully in water and left to dry overnight at room temperature. Finally, plates were scanned and clones were counted.

Flow cytometry

Cell cycle analysis: Cells were seeded in 60-mm petri dishes at 1.25–2.5 × 10⁶ cells/dish, left to adhere and treated as indicated for 24 h. Afterward, cells were trypsinized and washed in ice-cold PBS, fixed in 70% ethanol and stored at –20 °C until analysis. Fixed cells were suspended in 500 μl propidium iodide (PI)/ RNase staining buffer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), incubated for 30 min at 37 °C and analyzed in a BD FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson). Data analysis was performed using ModFit LT software (Verity software house, Topsham, ME, USA).

Measure of ROS: Cells were plated in 35-mm dishes at 3.5 or 7 × 10⁵ cells/dish, left to adhere for 1 day and treated with the indicated drugs for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. At the end Cell Rox Green Reagent (Life Technologies) was added to a final concentration of 2.5 μM and incubated for 30 min at 37 °C. Cells were washed twice in cold PBS, trypsinized and suspended in 1ml PBS. Cells were analyzed in a BD FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson).

Annexin V and propidium iodide staining: After 24 h of treatment with 10 μM SAHA, cells were collected and incubated with 1 μg/ml Annexin V-FITC (ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) and 2.5 μg/ml PI (BD Transduction Laboratories, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in 200 μl buffer containing 10 mM HEPES/KOH (pH 7.4), 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂ for 30 min at room temperature, and the cells were analyzed using a BD FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson).

Western blot and Immunofluorescence. Antibodies were obtained from commercial sources: Chk-1, MGMT, CAD, γ -Histone-2-AX (γ H2AX), Ki-67, and fodrin from Millipore (Billerica, MA, USA); Wee1, Caspase-3 and Caspase-9 from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); α -tubulin from Sigma; Cdk1, Cdk1-PY15, GAPDH and Cyclin B1 from Abcam (Cambridge, UK); Mus81 from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA); Survivin, TPX2, Rad51 from Novus Biologicals (Cambridge, UK); p21 and cdc25A from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Protein cell extracts and western blot was performed as previously described.⁴⁴ Blots were developed using the enhanced chemiluminescence (ECL) or Super Signal reagents (Thermo Scientific). Membranes were reprobed with anti- α -tubulin or anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies, or stained with naphthol blue black dye (Sigma) for loading control.

For immunofluorescence experiments, glioma cells were grown on glass coverslips of 12 mm diameter and treated as described. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature, blocked in 5% bovine serum albumin (BSA), 5% fetal bovine serum, 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h and incubated for 1 h at RT or overnight at 4 °C with primary antibodies. Samples were then incubated with secondary antibodies for 1 h, stained with Hoechst 33342 (Molecular Probes Life Technologies) and mounted using Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK) or Mowiol (Sigma) mounting medium. Secondary antibodies used were anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488 and anti-mouse IgG-Alexa Fluor 594 (Molecular Probes Life Technologies).

Quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from glioma cell lines after 24 h of treatment using the RNeasy kit Qiagen (Hilden, Germany) and quantified in a Nanodrop spectrophotometer (Wilmington, USA). Quantitative RT-PCR was performed using TaqMan Gene expression assays (Chk1, Wee1, Caspase 2 and GAPDH) and TaqMan Gene expression Master Mix (Life technologies) as previously described.⁴⁵

DNA integrity assay. Aliquots of treated and non-treated cells were collected by cell scraping, and pellets were frozen at -80 °C. DNA integrity was checked by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and low-molecular weight fragmentation by agarose gel electrophoresis following a previously described procedure.⁴⁴

Caspase activity assays. Caspase activity was measured as previously described.⁴⁶ Cells were treated with 10 mM VPA or 10 μ M SAHA for 24 h, in the presence or absence of 5 μ M Q-VD-OPh. Cells were lysed in a buffer containing 20 mM HEPES/NaOH (pH 7.2), 5 mM MgCl₂, 1%PMSF, 1% Triton, 5 mM EDTA and 10 mM DTT, and protein concentration in the lysates was measured by the DC Protein assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Equal loads of protein were added in 96-well plates and mixed with 50 mM of fluorogenic substrates: Ac-DEVD-AFC (Millipore, Billerica, MA, USA) for Caspase-3-like activity or Ac-VDVAD-AFC (ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) for Caspase-2 activity, both at a final concentration of 50 μ M in 96-well plates. Assay plates were incubated at 37 °C, and fluorescence was read at intervals of 1 h during the next 8 h in a BioTek FL 600 fluorimeter (BioTek Instruments, Inc.), with excitation filter set at 360 nm or 400 nm and emission filter at 530 nm or 505 nm for Caspase-3 or Caspase-2, respectively. Data obtained for different experimental conditions were compared within the linear phase of absorbance increase. Data are mean of four independent experiments.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Dr Nogues (Neurosurgery Unit, Arnau de Vilanova Hospital) for providing tumor biopsies and Dr Joan Seoane (VHIO, Barcelona, Spain) for his helpful advice on glioma cell line selection. We also acknowledge the gift of shRNA vectors against human CAD endonuclease to Dr Victor Yuste (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain), vectors for viral particle production to Didier Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland) and anti-carbonyl group antibody to Biochemistry of Oxidative Stress group (IRBLleida, Lleida, Spain). We thank Cristina Girón (IRBLleida), Carme Guerris (UdL), Anaïs Panosa (IRBLleida), Isabel Sanchez (UdL) and the Scientific-Technical Services of Universitat de Lleida for their skilled technical assistance. This work was supported by the Spanish Ministry of Health grant ISCIII and the European Fund for Regional Development (FEDE) PS09/00140 to ML, ISCIII-PI080790 to JH and

Programa de Suport a Grups de Recerca from the Government of Catalonia (AGAUR) (2009-SGR-346) to ML, DS and JXC.

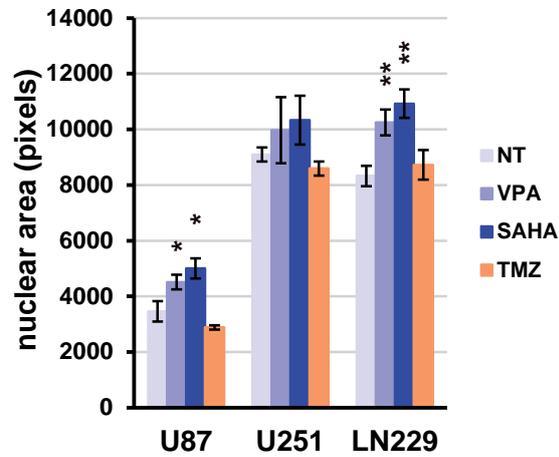
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; **21**: 2683–2710.
- Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; **359**: 492–507.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; **10**: 459–466.
- 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* 2011; **1815**: 241–252.
- Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett* 2009; **280**: 168–176.
- Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, Motta FJ, Queiroz RG, Machado HR et al. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoxexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer* 2008; **8**: 243.
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer Lett* 2009; **277**: 8–21.
- Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACi) mechanisms of action: Emerging insights. *Pharmacol Ther* 2014; **143**: 323–336.
- Carew JS, Giles FJ, Nawrookji ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* 2008; **269**: 7–17.
- Lee J-H, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 14639–14644.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT et al. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8461–8466.
- Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkin RA, Marks PA et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11700–11705.
- Mateen S, Raina K, Jain AK, Agarwal C, Chan D, Agarwal R. Epigenetic modifications and p21-cyclin B1 nexus in anticancer effect of histone deacetylase inhibitors in combination with silybinin on non-small cell lung cancer cells. *Epigenetics* 2012; **7**: 1161–1172.
- Shen T, Huang S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; **12**: 631–639.
- Beck H, Nahse-Kumpf V, Larsen MS, O'Hanlon KA, Patzke S, Holmberg C et al. Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of replication initiation and nucleotide consumption. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 4226–4236.
- Dominguez-Kelly R, Martin Y, Koundrioukoff S, Tanenbaum ME, Smits VAJ, Medema RH et al. Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol* 2011; **194**: 567–579.
- Del Nagro CJ, Choi J, Xiao Y, Rangell L, Mohan S, Pandita A et al. Chk1 inhibition in p53-deficient cell lines drives rapid chromosome fragmentation followed by caspase-independent cell death. *Cell Cycle* 2014; **13**: 303–314.
- Mir SE, De Witt Hamer PC, Krawczyk PM, Balaj L, Claes A, Niers JM et al. In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell* 2010; **18**: 244–257.
- Robert C, Rassool FV. HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair. *Advances in cancer research* 2012; **116**: 87–129.
- Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushiji K et al. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 2004; **23**: 4362–4370.
- Russell MR, Levin K, Rader J, Belcastro L, Li Y, Martinez D et al. Combination therapy targeting the Chk1 and Wee1 kinases shows therapeutic efficacy in neuroblastoma. *Cancer Res* 2013; **73**: 776–784.
- Guertin AD, Martin MM, Roberts B, Hurd M, Qu X, Miselis NR et al. Unique functions of CHK1 and WEE1 underlie synergistic anti-tumor activity upon pharmacologic inhibition. *Cancer Cell Int* 2012; **12**: 45.
- Huang X, Tran T, Zhang L, Hatcher R, Zhang P. DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 1065–1070.
- Brazelle W, Krehling JM, Gemmer J, Ma Y, Cress WD, Haura E et al. Histone deacetylase inhibitors downregulate checkpoint kinase 1 expression to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 2010; **5**: e14335.
- Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R 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 USA* 2001; **98**: 10833–10838.
- Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G et al. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 673–678.

27. Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, Muschel RJ, Lazar MA, Yen TJ. Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J Cell Biol* 2003; **160**: 1017–1027.
28. Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, Knutson SK, Cortez D, Sun Z-WW et al. Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell* 2008; **30**: 61–72.
29. Forment JV, Blasius M, Guerini I, Jackson SP. Structure-specific DNA endonuclease Mus81/Erme1 generates DNA damage caused by Chk1 inactivation. *PLoS One* 2011; **6**: e23517.
30. Stevens FE, Beamish H, Warrener R, Gabrielli B. Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage. *Oncogene* 2008; **27**: 1345–1354.
31. Noh EJ, Lim D-S, Jeong GLee J-S. An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G2/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **378**: 326–331.
32. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhitovskiy B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1153–1162.
33. Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, Buggy JJ. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 19482–19487.
34. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 4912–4922.
35. Kachhap SK, Rosmus N, Collis SJ, Kortenhorst MSQ, Wissing MD, Hedayati M et al. Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One* 2010; **5**: e11208.
36. Lens SM a, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18**: 616–622.
37. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 2007; **249**: 49–60.
38. Tu SP, Cui JT, Liston P, Huajiang X, Xu R, Lin MCMM et al. Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology* 2005; **128**: 361–375.
39. Carvalho A. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2987–2998.
40. Guvenc H, Pavlyukov MS, Joshi K, Kurt H, Banasavadi-Siddegowda YK, Mao P et al. Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin-Ran protein complex. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 631–642.
41. Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocaña A, Peñuelas S, Arias A et al. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 2007; **11**: 147–160.
42. Zhang J, Ye J, Altafaj A, Cardona M, Bahi N, Llovera M et al. EndoG links Bnip3-induced mitochondrial damage and caspase-independent DNA fragmentation in ischemic cardiomyocytes. *PLoS One* 2011; **6**: e17998.
43. Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guñon E, Gabernet G, Garcia-Belinchón M, Sánchez-Osuna M, Casanelles E et al. Apoptotic DNA degradation into oligonucleosomal fragments, but not apoptotic nuclear morphology, relies on a cytosolic pool of DFF40/CAD endonuclease. *J Biol Chem* 2012; **287**: 7766–7779.
44. Bahi N, Zhang J, Llovera M, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Switch from Caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease g in ischemia-induced dna processing of differentiated cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2006; **281**: 22943–22952.
45. Ye J, Llorian M, Cardona M, Rongvaux A, Moubarak RS, Comella JX et al. A pathway involving HDAC5, cFLIP and caspases regulates expression of the splicing regulator polypyrimidine tract binding protein in the heart. *J Cell Sci* 2013; **126**: 1682–1691.
46. Sanchis D, Mayorga M, Ballester M, Comella JX. Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 977–986.



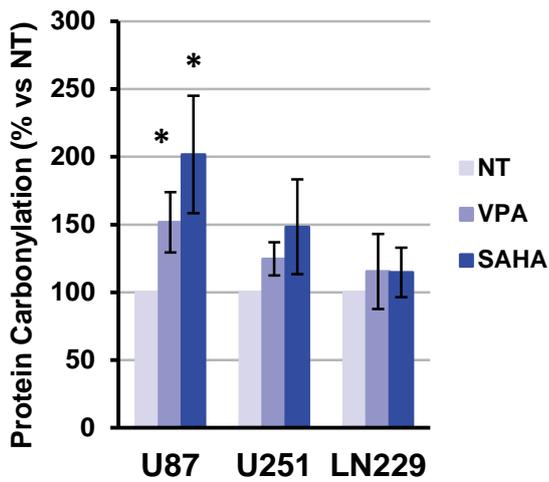
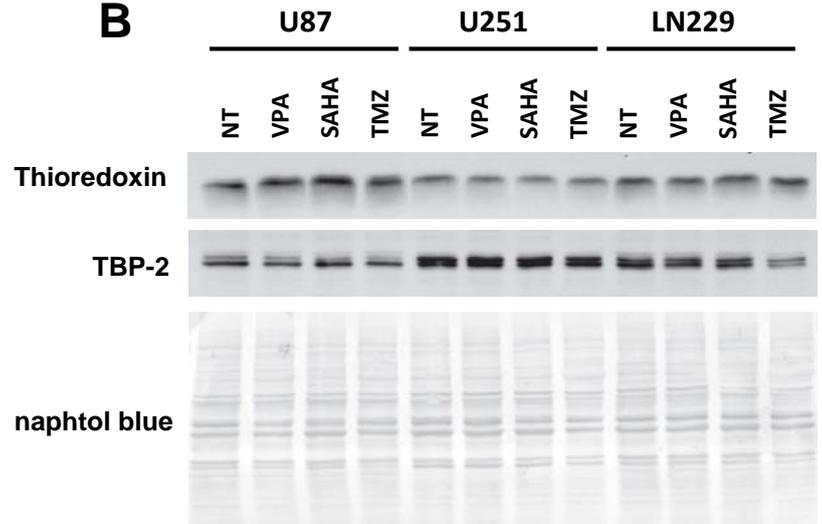
Cell Death and Disease is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under a **Creative Commons Attribution 4.0 International Licence**. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons licence, users will need to obtain permission from the licence holder to reproduce the material. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)



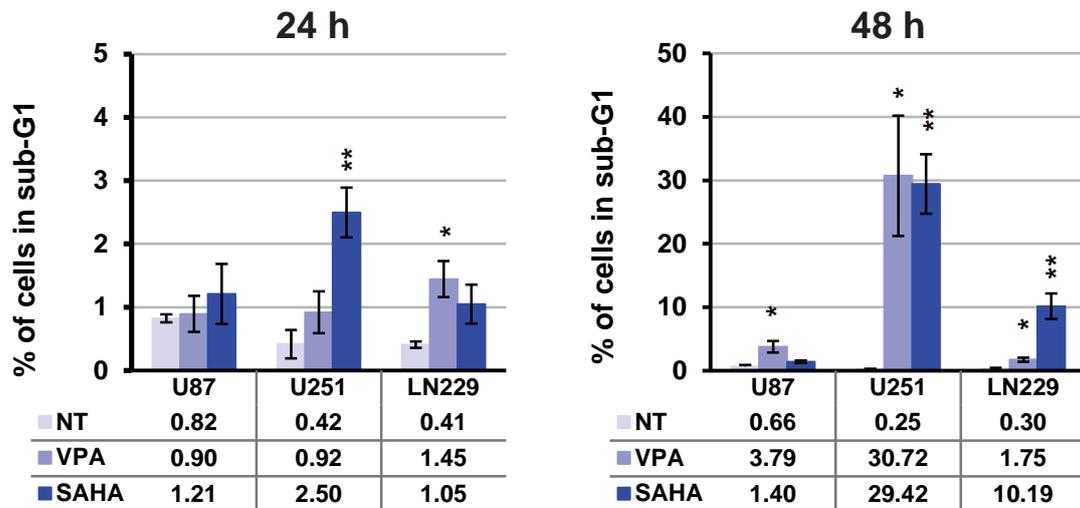
Supplementary Figure 1.

HDACi treatment of glioma cells cause an increase in the size of the nucleus. Glioma cells were treated with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA, 100 μ M TMZ or left untreated. Nuclear area was measured on fluorescence pictures of Hoechst stained cells by using the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014). Data represent Mean and S.E.M of four independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student T-test and significance is represented by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

A**B**

Supplementary Figure 2.

A. Total protein carbonylation quantified from western blots on total cell lysates. Cells were treated with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or 100 μ M TMZ for 24 hours. Results shown are Mean and SEM from 4 independent experiments. **B.** Analysis of the effect of HDACi on Thioredoxin and Thioredoxin binding protein 2 (TBP-2) protein expression in glioma cells. After 24h-treatment with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or 100 μ M TMZ, cells were lysed and analyzed by electrophoresis and western blot using specific antibodies from ThermoFisher Scientific against Thioredoxin 1 (MA5-1494) and TBP-2 (PA5-23485). Equal loading was verified by naphtol blue membrane staining (lower panel).



Supplementary Figure 3

HDACi treatment of glioma cells cause an increase in the amount of cells in sub-G1 by cell cycle analysis. Percentage of cells in sub-G1 by flow cytometry analysis of DNA content after 24h (left graph) or 48h (right graph) of treatment. Glioma cells were treated for 24 h and 48h with 10 mM VPA, 10 μ M SAHA or left untreated. Results are mean and S.E.M. from three independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student T-test and significance is represented by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

