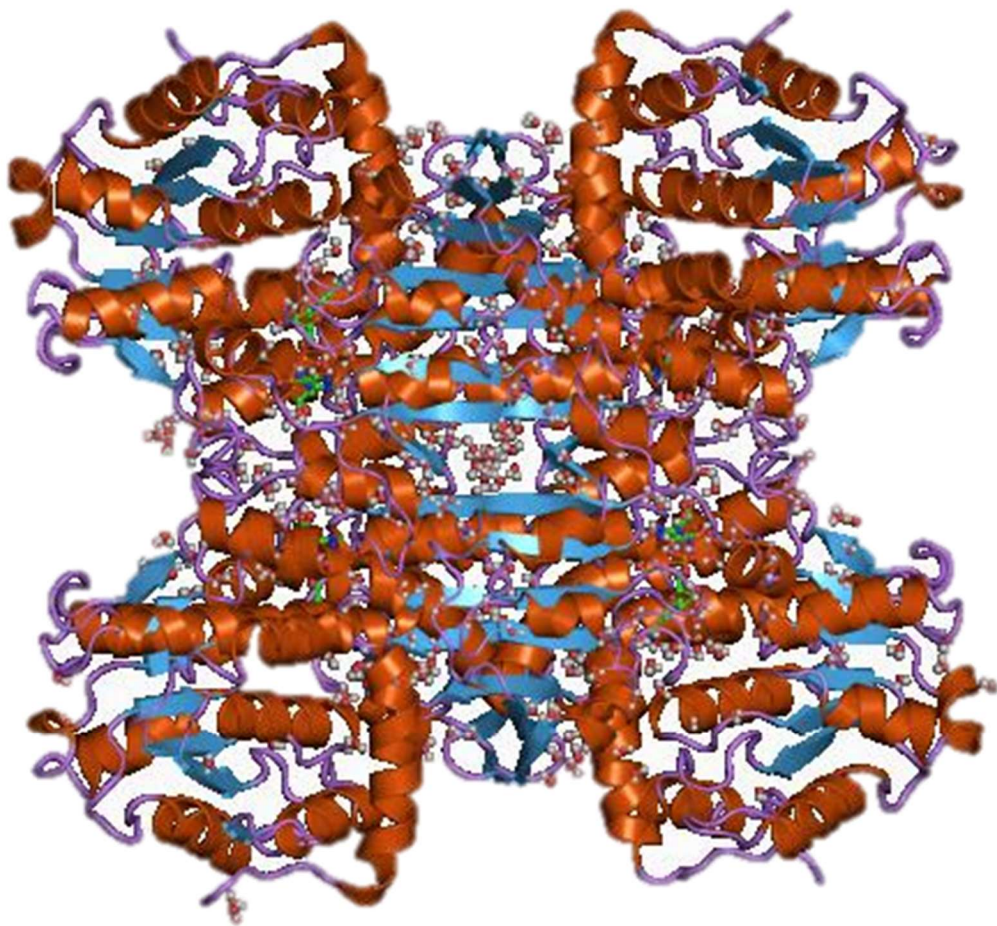


# Papel de S-adenosilhomocisteína hidrolasa en sarcoma



**Asunción Espinosa Sánchez**

Facultad de farmacia

Universidad de Sevilla



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

**Trabajo Fin de Grado**

Grado en farmacia

# **PAPEL DE S-ADENOSILHOMOCISTEÍNA HIDROLASA EN SARCOMA**

**Asunción Espinosa Sánchez**

Convocatoria de Julio 2018

**Tutor:** Juan José Marín

**Departamento:** Medicina Preventiva y Salud Pública

Trabajo experimental

Realizado en el laboratorio de Biología Molecular del Cáncer dirigido por

## Resumen

Los sarcomas son tumores en partes blandas o huesos procedentes del tejido conectivo. Tiene múltiples subtipos, de ahí la dificultad de su abordaje terapéutico. Este trabajo se centra en la implicación de S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH, EC 3.3.1.1, AHCY) en este tipo de tumor. Esta enzima se comporta como un inhibidor competitivo de las reacciones metiltransferasa dependientes de S-adenosil metionina. La metilación del ADN y modificación de las histonas puede provocar el silenciamiento epigenético de los genes supresores de tumores, evento temprano de tumorigénesis.

En este estudio analizamos, en primer lugar, los niveles de SAHH en muestras tumorales de sarcoma y observamos que altos niveles de expresión de SAHH conducen a una disminución en la supervivencia. Además, existe una tendencia en la mejora de la supervivencia global cuando los pacientes con elevados niveles de expresión de SAHH son tratados con doxorubicina como primera línea y, posteriormente, con trabectedina, a diferencia del tratamiento único con doxorubicina. Asimismo, se comprobó la existencia de una correlación de Pearson positiva entre los niveles de expresión de SAHH y la citotoxicidad a camptotecina en las líneas celulares de sarcoma, donde el aumento en dichos niveles empeoraba la respuesta a este fármaco. Por último, el tratamiento conjunto de topotecán, derivado de camptotecina, y SAHA (Ácido hidroxámico suberoilánilida) provoca el incremento en la susceptibilidad a topotecán, con respecto al tratamiento exclusivo con dicho fármaco. Esto indica que SAHA puede actuar inhibiendo a SAHH dando lugar a la hipometilación del ADN que desencadena en mayor accesibilidad para la acción de topotecán.

## Palabras clave

*Sarcoma, SAHH, supervivencia, doxorubicina y topotecán*

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
1.1 Sarcoma .....	4
1.2 S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH).....	5
<b>2. Objetivo .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>9</b>
3.1 Cultivo de líneas celulares de sarcoma.....	9
3.2 Extracción de ARN.....	11
3.3 Retrotranscripción .....	12
3.4 Q-PCR .....	14
3.5 Ensayo IC50.....	15
3.6 Correlación SAHH ARNm – Antineoplásicos .....	16
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>17</b>
4.1 Niveles de ARNm SAHH.....	17
4.2 Sensibilidad a diversos fármacos en líneas celulares de sarcoma.....	24
4.3 Relación entre SAHH y otros genes .....	30
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>33</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>34</b>

# 1. Introducción

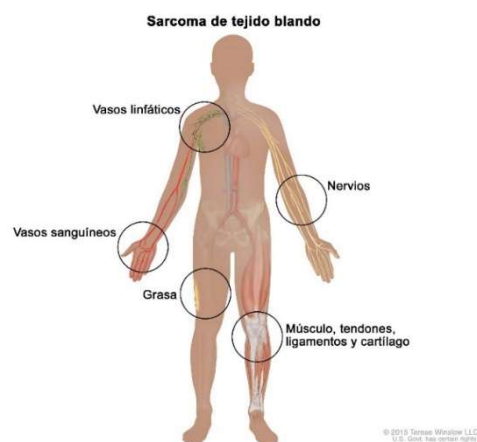
## 1.1 Sarcoma

Los tumores se pueden clasificar en función de su lugar de origen (mama, pulmón, colorrectal, próstata...) o por el tejido o célula del que proceden. Según este último se pueden distinguir: carcinomas, sarcomas, leucemias, melanomas y tumores del sistema nervioso central. En este caso, nos centraremos en los sarcomas.

Los sarcomas son tumores en partes blandas o huesos procedentes del tejido conectivo, por ello, pueden aparecer en cualquier parte del organismo. Este tipo de cáncer tiene múltiples subtipos, de ahí la dificultad de su abordaje terapéutico.

El sarcoma de partes blandas se genera a partir de tejido de soporte, como el liposarcoma, mientras que los tumores de hueso se producen a partir de tejido óseo, como el osteosarcoma.

Entre los más de 50 tipos de sarcomas, se ha comprobado que están definidos por su patología molecular y no por el órgano de origen como otros tipos de cáncer. La etiología de estos tumores es desconocida ya que la mayoría ocurren por mutaciones espontáneas, aunque hay un pequeño porcentaje que procede de alteraciones hereditarias. Actualmente, la solución más común es la cirugía, sin embargo, los tumores irresecables se tratan con radioterapia. En los pacientes con metástasis se emplea la quimioterapia sistémica mediante doxorubicina como fármaco de primera línea (Moneo, 2009) o camptotecina.

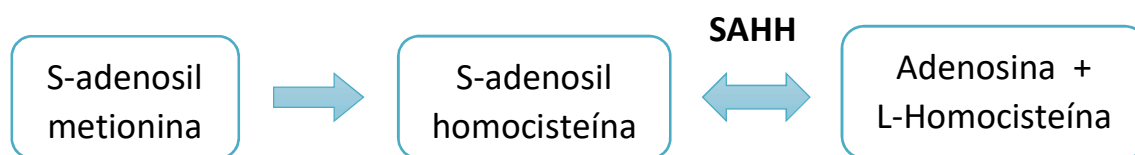


**Figura 1.** Tipos de sarcoma. Winslow T. (2015) Soft Tissue Sarcoma. [Imagen]. Recuperado de <https://www.cancer.gov>

## 1.2 S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH)

S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH, EC 3.3.1.1, AHCY) se encuentra principalmente en hígado, páncreas y riñón. Esta enzima se compone de 2 cadenas alfa y 2 beta, unidas por puentes disulfuro. El gen que codifica a SAHH se encuentra situado en el cromosoma 20.

La S-adenosil metionina (SAM) es un donante fundamental de grupos metilo en el organismo que mediante una reacción de transmetilación se convierte en S-adenosil homocisteína (SAH). Este último, se transforma en adenosina (Ado) y L-homocisteína (LHcy) gracias a una reacción de hidrólisis reversible catalizada por S-adenosil homocisteína hidrolasa (Travieso et al., 2006) (Figura 2).



**Figura 2.** Reacción metiltransferasa dependiente de S-adenosil metionina donde interviene SAHH.

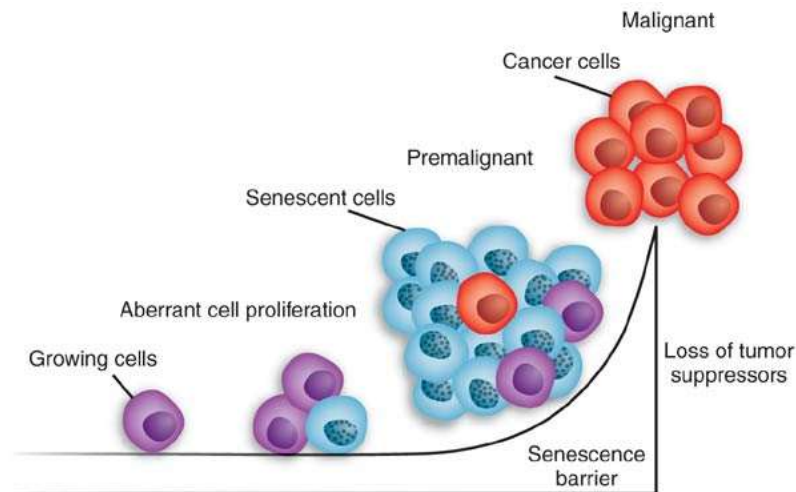
Esta enzima se comporta como un inhibidor competitivo de las reacciones de metiltransferasa dependientes de S-adenosil metionina (GIBSON et al., 1961).

La deficiencia en esta enzima conduce a la aparición de coagulopatía grave, hepatopatía y miopatía.

Se ha demostrado en otros estudios que la regulación negativa de S-adenosilhomocisteína hidrolasa, SAHH, da lugar a una acumulación de S-adenosil homocisteína, SAH, que produce la inhibición de las reacciones de transmetilación del ADN. Este acontecimiento provoca la modulación de la senescencia en células primarias (Leal et al., 2008b).

La senescencia celular es un mecanismo de transducción de la señal que conlleva a la detención irreversible del ciclo celular. Los telómeros son regiones de ADN no codificantes que se encuentran en los extremos del cromosoma y su función es

estabilizar al ADN de las células. Sin embargo, en cada división celular de células somáticas, los telómeros se acortan progresivamente. Cuando se alcanza la longitud crítica, las células detienen su crecimiento produciéndose la senescencia replicativa (Figura 3).

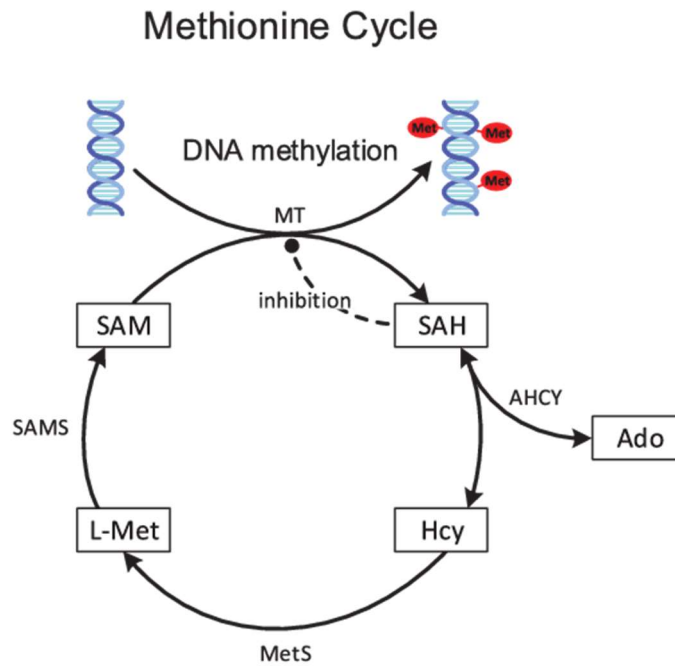


**Figura 3.** Senescencia celular. Tomada de Narita y Lowe, 2005.

En otros estudios, se midió la expresión de ARNm (ARN mensajero) y los niveles de proteínas de SAHH en tumores humanos de 206 pacientes, y se obtuvieron resultados, tales como, la pérdida del 50% de ARNm de SAHH de los tejidos de diferentes tipos de tumor en comparación con tejidos normales del mismo paciente (Leal et al., 2008a). También, se observó que en las líneas celulares de sarcoma con bajos niveles de SAHH y tratadas con doxorubicina no fueron capaces de mantener la estimulación de p53, lo que hacía pensar que SAHH interfería en la actividad transcripcional de p53 (Leal et al., 2008a).

Por tanto, se demostró que SAHH participa en la vía supresora de tumores p53 y en menor medida de pRb, disminuyendo también su actividad transcripcional (Leal et al., 2008a).

La actividad de esta enzima desempeña, por tanto, un papel crítico en la regulación de la concentración intracelular de SAH, ya que provoca la acumulación de ésta provocando la inhibición de la metilación por un mecanismo de retroalimentación negativo (Figura 4).



**Figura 4.** Implicación de SAHH (AHCY) en el ciclo de la metionina.

Tomada de Basler et al., 2016.

La metilación es un mecanismo bioquímico que regula la expresión génica de muchos procesos fisiológicos (Radomski et al., 2002), por tanto, debe estar modulado ya que se han detectado alteraciones en la metilación en lesiones malignas. El silenciamiento epigenético de los genes supresores de tumores a través de la metilación del ADN y la modificación de las histonas podría ser un evento temprano de tumorigénesis (Hinshelwood et al., 2007).

La hipótesis en este trabajo es conocer si sufren variaciones los niveles de SAHH en el tejido tumoral respecto al tejido no tumoral del mismo paciente. Debido a esto y a su importante función biológica, es posible que la regulación de la metilación por SAHH tenga repercusión en la eficacia de diversos fármacos.



## **2. Objetivo**

Este trabajo se centra en estudiar la implicación de S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH) en el sarcoma y la sensibilidad de determinados fármacos según el nivel de expresión de este gen.

- Medir los niveles de expresión de SAHH en líneas celulares de sarcoma y en muestras tumorales de sarcoma de pacientes pertenecientes al estudio GEIS-20.
- Correlacionar los niveles de expresión de SAHH con la supervivencia.
- Búsqueda de correlación entre los niveles de expresión de SAHH y el IC50 de diversos fármacos para mejorar la respuesta a éstos.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Cultivo de líneas celulares de sarcoma

En este trabajo, se emplearon 13 líneas celulares de sarcoma, cultivadas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Se han utilizado dos medios de cultivo diferentes dependiendo de la línea celular, F10 y DMEM. En la tabla 1, se detalla el medio de cultivo que se utilizó para cada línea celular. Antes del empleo de cada medio se debía adicionar una serie de sustancias, tales como, Suero Fetal Bovino (FBS), glutamina, antibiótico y antifúngico.

En la tabla 1 también se puede observar los diversos tipos de sarcoma que se han empleado para el estudio, así como, el tipo de línea celular, primaria o comercial. Las líneas primarias fueron generadas en el laboratorio a partir de tumores humanos, mientras que las comerciales proceden de ATCC (“American Type Culture Collection”).

**Tabla 1.** Líneas celulares de sarcoma empleadas durante el estudio, el origen del tumor, tipo de línea y medio de cultivo utilizado para cada una de ellas.

Línea celular	Origen del tumor	Primaria (P) / Comercial (C)	Medio de cultivo
AA	Leiomiomasarcoma	P	F10
AX	Liposarcoma	P	F10
AW	Liposarcoma	P	F10
AZ	Tumor fibroso	P	F10
BG	Fibrosarcoma mixoide	P	F10
BC	MPNST	P	F10
CE	Rabdomiosarcoma	P	F10
CP0024	Leiomiomasarcoma	C	F10
SAOS-2	Osteosarcoma	C	DMEM
A673	Sarcoma de Ewing	C	DMEM
93T449	Liposarcoma	C	DMEM
SKUT-1	Leiomiomasarcoma	C	DMEM
SW872	Liposarcoma	C	DMEM

- Procedimiento:

El procedimiento comenzaba con la descongelación de cada línea celular, conservadas a -80°C. En primer lugar, se procedía a la centrifugación para eliminar los restos de dimetilsulfóxido (DMSO), necesario para una correcta conservación durante la congelación. Posteriormente, se resuspendía el precipitado en el medio adecuado según la línea (F10 o DMEM) y se adicionaba el contenido a la placa de Petri.

Para controlar el crecimiento celular de cada línea se observaban las placas al microscopio óptico. La viabilidad de las células se mantenía cambiando el medio de cultivo cada 3 días dependiendo del estado de éstas.

Cuando la placa estaba confluyente se dividía con el factor de dilución adecuado dependiendo de la velocidad de crecimiento de las líneas. Para ello, se empleaba una pequeña cantidad de tripsina (1 ml), proteasa que se encarga de despegar las células adherentes de la placa.

La división de las células de la misma línea en varias placas permitía la posterior recolección de células para extraer el ARN y realizar el ensayo IC50 (concentración que produce la inhibición del 50% de crecimiento o apoptosis de las células) por triplicado.

Todas las manipulaciones se realizaban en una cabina de flujo laminar (nivel 2 de seguridad biológica).

### 3.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN es necesaria la previa recolección de las células de cada línea celular. Se procedía a retirar el medio y lavar con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, se adicionaba 1ml de PBS y se empleaba un rascador que levanta las células de la placa. El líquido se recoge mediante una pipeta y se introduce en un eppendorf. Posteriormente, se centrifuga durante 5 minutos a 10000 rpm. Finalmente, esto se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de ARN.

Se siguió el protocolo “ReliaPrep RNA Cell Miniprep System” que consta de una serie de pasos:

1. Añadir BL + Tampón TG según el número de células que contenga el pellet antes de que se descongelen las células. Dispersar el pellet mediante pipeteo.
2. Agregar isopropanol 100% según el número de células que contenga el precipitado. Mezcla mediante vortex durante 5 segundos.
3. Transferir el lisado a las minicolumnas y centrifugar 12000 x g durante 30 segundos.
4. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de la solución de lavado de ARN a las minicolumnas. Centrifugar a 12000 x g durante 30 segundos.
5. Añadir 30  $\mu\text{L}$  de la mezcla de incubación de DNasa. Incubar durante 15 minutos a  $20-25^{\circ}\text{C}$ .
6. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de solución de lavado de columna a las minicolumnas y centrifugar 12000 x g durante 15 segundos.
7. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado de columna a las minicolumnas y centrifugar 12000 x g durante 30 segundos.
8. Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de solución de lavado de ARN y centrifugar a alta velocidad durante 2 minutos.
9. Transferir a tubo de elución y agregar agua libre de nucleasa según el número de células del pellet.

Una vez realizados todos los pasos, se procedió a la cuantificación de ARN en el equipo Nanodrop.

### 3.3 Retrotranscripción

Este proceso se caracteriza por generar ADN complementario (ADNc) de doble cadena a partir del ARN de cadena simple extraído anteriormente.

Para realizar la retrotranscripción de las muestras, se siguió el protocolo “High Capacity cDNA Reserve Transcription Kits”. Para comenzar se preparó la mezcla de retrotranscripción según el número de muestras (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cantidad de los componentes de la mezcla de retrotranscripción.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen/reacción (μL)</i>	<i>Volumen x 13 muestras + 10%</i>
Tampón RT	2,0	28,6
dNTP Mix (100 Mm)	0,8	11,44
RT Random Primers	2,0	28,6
Transcriptasa inversa	1,0	14,3
Agua libre de nucleasa	4,2	60,06
Total por reacción	10	143

El tampón de la reacción va a ayudar a mantener un pH y una fuerza iónica favorables para la reacción. La mezcla de desoxinucleótidos (dNTP Mix) son las bases nitrogenadas que se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno formando la cadena de ADN. Los cebadores corresponden a los RT random primers, que son complementarios a la hebra de ADN que se pretende sintetizar. Por último, la transcriptasa inversa es una enzima de tipo ADN-polimerasa encargada de catalizar la reacción.

La mezcla de retrotranscripción preparada y las muestras debían permanecer en hielo para evitar la degradación. Se prepararon varios eppendorf con 10 μL de la mezcla anteriormente descrita y se añadió la cantidad calculada de cada muestra y agua, según la concentración de ARN, siendo el volumen final de la reacción 20 μL (Tabla 3).

**Tabla 3.** Volumen de cada muestra y agua según la concentración de ARN obtenida tras la extracción de ARN.

	ARN (ng/ $\mu$ L)	Volumen de muestra ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O
<b>93T449</b>	335,47	2,38	7,62
<b>AA</b>	239,43	3,34	6,66
<b>AZ</b>	91,87	8,71	1,29
<b>A673</b>	246,30	3,25	6,75
<b>SKUT1</b>	662,30	1,21	8,79
<b>SW872</b>	206,50	3,87	6,13
<b>BC</b>	211,37	3,78	6,22
<b>SAOS 2</b>	128,27	6,24	3,76
<b>AW</b>	300,83	2,66	7,34
<b>BG</b>	137,60	5,81	4,19
<b>CE</b>	115,77	6,91	3,09
<b>AX</b>	134,60	5,94	4,06
<b>CP0024</b>	114,37	7,00	3,00

Por último, se colocó en el termociclador y se programa el ciclo de temperaturas que se muestra en la tabla 4:

**Tabla 4.** Temperatura y tiempos del termociclador para realizar la retrotranscripción.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	25	37	85	4
<b>Tiempo</b>	10 min	120 min	5 min	$\infty$

Una vez terminado el proceso, se conservó a  $-80^{\circ}$ C para dar lugar al siguiente paso.

### 3.4 Q-PCR

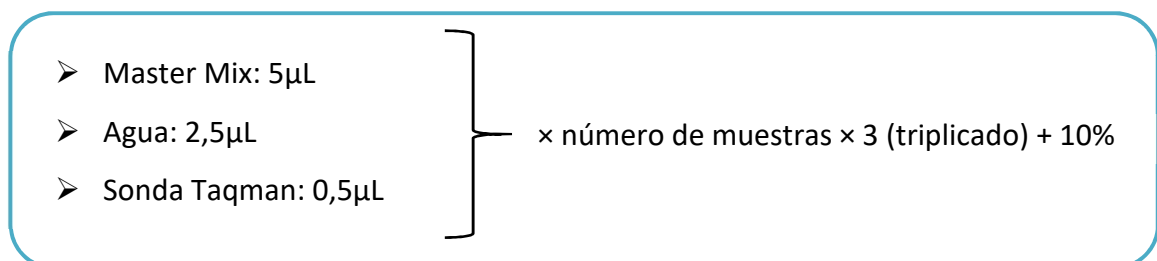
La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el ADN o ARN mensajero (ARNm) de una muestra.

El método consiste en la adición a la mezcla de reacción de una sonda marcada con fluorocromos (sondas Taqman) que es específica para el gen en estudio. Al introducirlo en un termociclador que tiene sensores para medir la fluorescencia, el fluorocromo se excita a la longitud de onda apropiada permitiendo medir la generación de uno o más productos específicos de forma simultánea. El proceso consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten durante 40-50 ciclos.

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retrotranscripción, se puede determinar la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Se denomina relativa ya que se comparan los valores Ct (ciclo umbral) del gen específico (SAHH) respecto al gen constitutivo (GAPDH), para ello, se emplea  $2^{\Delta Ct}$  que expresa la proporción de los valores Ct entre los dos genes.

- Procedimiento:

Se preparan las dos mezclas de reacción que constan de Master Mix, agua libre de nucleasa y, a cada una de ellas, la sonda de la proteína control (GAPDH) y en estudio (SAHH), tal como se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Componentes de la mezcla de reacción Q-PCR

Posteriormente, utilizando una placa de 396 pocillos se cargaban, en cada pocillo, 2 µl de muestra, ADNc de las diferentes líneas celulares, y 8 µl de una de las mezclas que contiene la sonda específica. Se realizó para la proteína control y SAHH por triplicado. Finalmente, se introdujo la placa en el termociclador durante 40 ciclos.

Para analizar los datos obtenidos en el proceso, previamente se comprueba que los triplicados realizados coinciden. Posteriormente, se escogen los datos referidos a Ct, el cálculo del Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la curva.

Los resultados que se obtienen en la Q-PCR están basados en la detección y cuantificación de los fluorocromos a lo largo de la reacción. Esto permite saber la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde el aumento del producto se correlaciona con la cantidad inicial de ARN en estudio (Walker, 2002). Por último, utilizando el programa informático Excel se obtienen los gráficos de barra de cada línea celular dependiendo de los niveles de ARNm de SAHH.

### **3.5 Ensayo IC50**

La placa madre de los fármacos empleados se preparaba realizando diluciones 1:3 a partir de una concentración determinada. En el caso de doxorrubicina, la concentración superior con la que se trató fue de 10 $\mu$ M, mientras que en topotecán fue de 1 $\mu$ M.

El ensayo se puede realizar cuando las placas tengan aproximadamente un 80% de confluencia en estadio de crecimiento exponencial. Primero se lavan con PBS y se tratan con una pequeña cantidad de tripsina. Cuando las células se han levantado de la placa, se añade medio de cultivo para bloquear la acción de la tripsina y se traspasa a un reservorio para proceder a la siembra en la placa de 96 pocillos. Se realizaron tres repeticiones de cada línea celular por cuatriplicado para que el resultado fuera significativo. A las 24 horas, se comprueba el crecimiento uniforme de las células en todos los pocillos y se procede al tratamiento con el fármaco, obteniendo una concentración final del fármaco determinada.

Después de 4 días, se fija con glutaraldehído durante 30 minutos y se tiñe con cristal violeta ( $A=595\text{nm}$ ) durante mínimo 30 minutos en agitación constante. Posteriormente, se deja secar al aire. Por último, se revela utilizando ácido acético mediante espectrofotometría dando valores de absorbancia que se pueden correlacionar con la concentración de fármaco. Así se puede obtener el IC50 mediante el empleo del programa informático Excel.



### 3.6 Correlación SAHH ARNm – Antineoplásicos

Se realizó el IC 50 de doxorubicina y camptotecina, y se correlacionó con los niveles de ARNm de SAHH. Para ello, se emplearon dos métodos de correlación:

Uno de ellos fue la regresión lineal entre los niveles de ARNm de SAHH y el IC 50 del fármaco. Posteriormente, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). El nivel de precisión en la predicción depende de  $R^2$  o coeficiente de determinación lo cual es el cuadrado de coeficiente de correlación.

Existen dos tipos de correlación:

1. Correlación positiva: cuando  $r$  está entre 0 y +1. Los valores de X e Y tienden a moverse en la misma dirección.
2. Correlación negativa: cuando  $r$  está entre -1 y 0. Cuando uno aumenta el otro tiende a disminuir y viceversa.

También se realizó un análisis estadístico t- student, gracias al programa informático Graphpad prism, para todos los fármacos. Para ello, se debía clasificar en dos grupos, alta y baja expresión de ARNm de SAHH. Esta clasificación se obtuvo realizando la media aritmética de los niveles de ARNm de SAHH.

## 4. Resultados y discusión

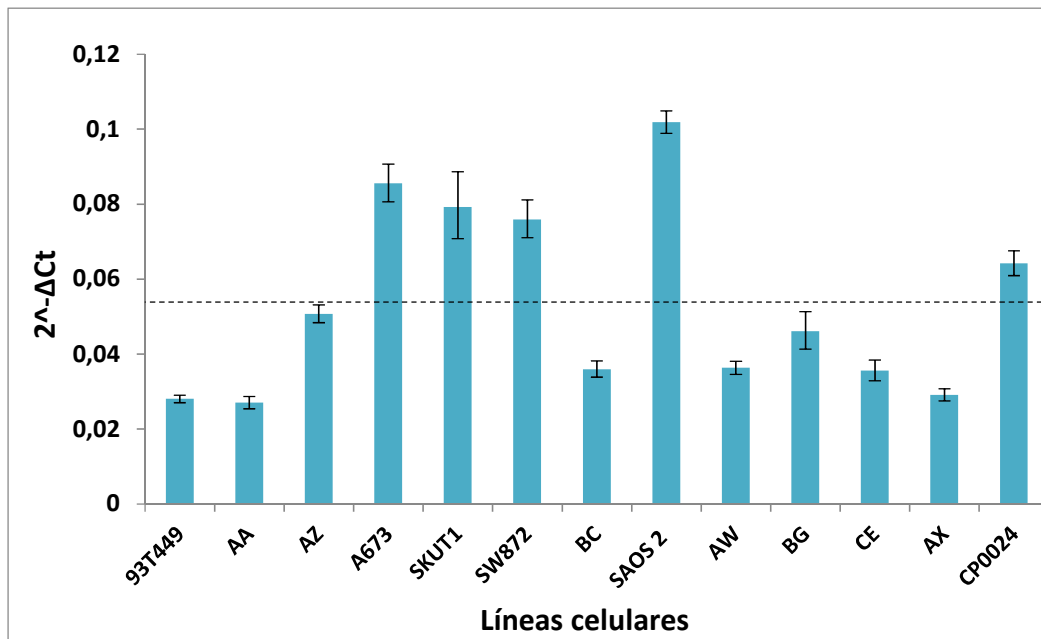
### 4.1 Niveles de ARNm SAHH

Para profundizar en el estudio de SAHH, se midieron, en primer lugar, los niveles de expresión de SAHH de líneas celulares de sarcoma de distintos orígenes. Para ello, se empleó la RT-Q-PCR (tabla 5). Se analizó el ARNm ya que es comparable con los resultados de otras bases de datos publicados. Se calculó la media aritmética de  $2^{-\Delta Ct}$  y se clasificaron las líneas en dos grupos, alta y baja expresión de ARNm de SAHH. Además, en esta tabla se puede observar que el subtipo de sarcoma de cada una de las líneas celulares no se correlaciona con el nivel de expresión de SAHH.

En el gráfico 1, se ha realizado una comparativa para poder determinar claramente la diferencia entre los niveles de ARNm de SAHH de las líneas celulares de sarcoma analizadas.

**Tabla 5.** Valores de  $2^{-\Delta Ct}$  de las líneas celulares de sarcoma, desviación estándar y origen del tumor. Líneas celulares clasificadas en alta y baja expresión de SAHH según la media aritmética.

Líneas	Origen del tumor	$2^{-\Delta Ct}$	SD	
<b>AZ</b>	Tumor fibroso	0,0507	± 0,067	<b>Baja expresión de SAHH</b>
<b>BG</b>	Fibrosarcoma mixoide	0,0461	± 0,156	
<b>AW</b>	Liposarcoma	0,0363	± 0,07	
<b>BC</b>	MPNST	0,0359	± 0,086	
<b>CE</b>	Rabdomiosarcoma	0,0356	± 0,113	
<b>AX</b>	Liposarcoma	0,0291	± 0,08	
<b>93T449</b>	Liposarcoma	0,028	± 0,052	
<b>AA</b>	Leiomiomasarcoma	0,027	± 0,088	
<b>SAOS 2</b>	Osteosarcoma	0,1018	± 0,042	<b>Alta expresión de SAHH</b>
<b>A673</b>	Sarcoma de Ewing	0,0855	± 0,085	
<b>SKUT1</b>	Leiomiomasarcoma	0,0792	± 0,162	
<b>SW872</b>	Liposarcoma	0,0759	± 0,096	
<b>CP0024</b>	Leiomiomasarcoma	0,0641	± 0,074	
<b>Media</b>		0,0535		



**Gráfico 1.** Nivel de SAHH ARNm de las líneas celulares de sarcoma.

Una vez obtenidos los resultados de los niveles de expresión de SAHH en líneas tumorales, se procedió a estudiar si en sarcomas humanos primarios también se mostraban variaciones importantes en los niveles de expresión.

Se realizó un estudio con pacientes incluidos en el ensayo GEIS-20 (Grupo Español De Investigación de Sarcoma). Es un ensayo en fase II aleatorizado, abierto, multicéntrico y prospectivo en pacientes tratados con doxorubicina o doxorubicina en primera línea y, posteriormente, trabectedina. Éstos padecían sarcoma de partes blandas avanzados no operables y/o metastásicos, donde el tipo de tumor más frecuente fue leiomiomasarcoma (Tabla 6). El número de pacientes empleado en nuestro ensayo fue de 43 pacientes.

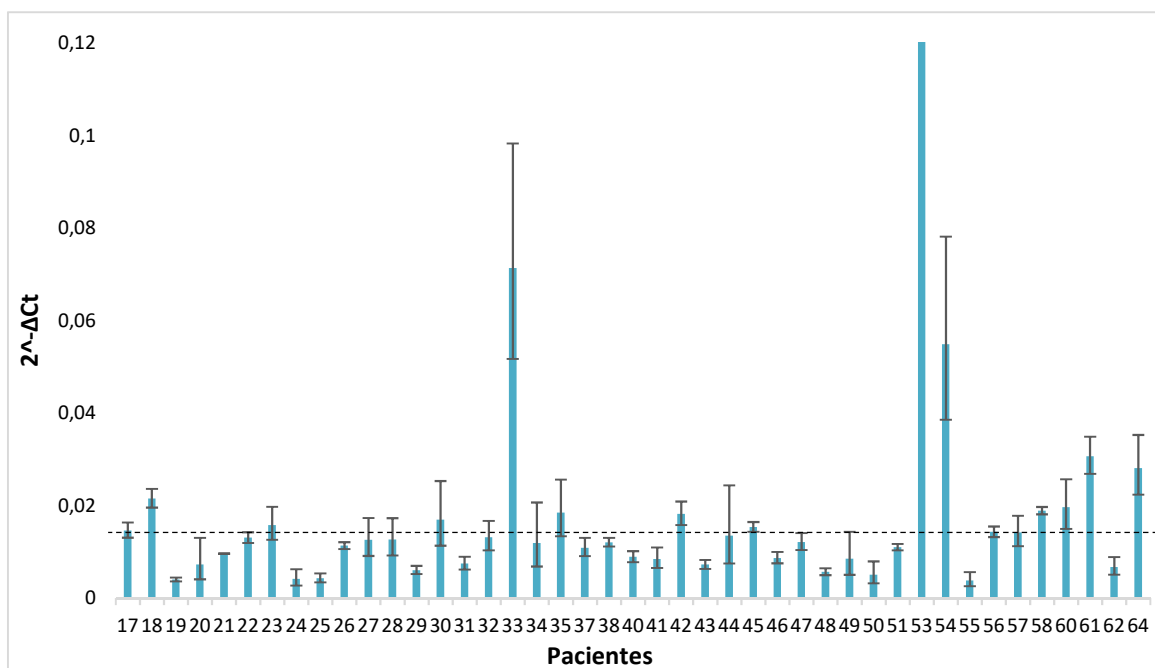
Además, el hecho de utilizar tumores primarios permitía encontrar una correlación entre los niveles de ARNm de SAHH de los tumores extraídos de tales pacientes y la supervivencia libre de progresión (SLP).

Los resultados que se obtuvieron de la Q-PCR fueron los que se reflejan en el gráfico 2. Como se puede observar, no hay grandes diferencias en los niveles de ARNm de SAHH entre los diferentes tumores analizados. Por ello, no se pudo realizar una curva

ROC, que es una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad de los valores para poder establecer un punto de inflexión y, así, clasificar los pacientes en altos o bajos niveles de expresión de ARNm de SAHH. Sin embargo, tres pacientes destacaban por contener altos niveles de expresión de SAHH (pacientes nº 33, 53 y 54), de los cuales el paciente 53 se consideró fuera de margen.

Se clasificaron los niveles de expresión de SAHH según la media aritmética y la mediana. Posteriormente, se realizó el análisis empleando la metodología Kaplan meier entre la categorización de los niveles de SAHH y la supervivencia libre de progresión (SLP), para así estimar la probabilidad de supervivencia en un determinado periodo de tiempo.

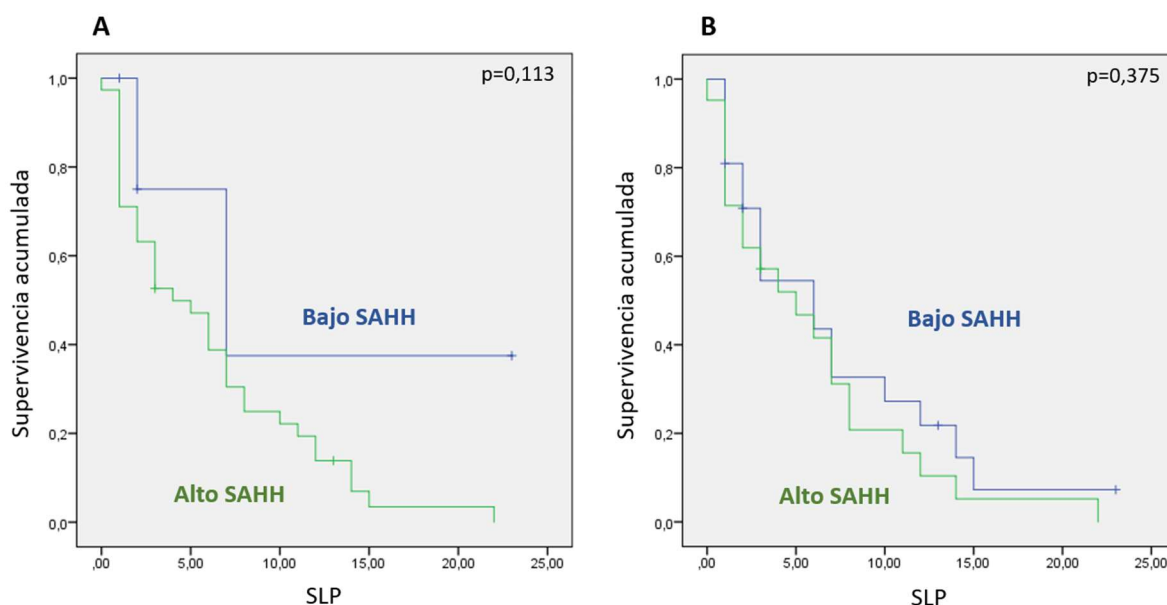
Como se observa en la figura 6, cuando los niveles de SAHH son altos, considerado con el número 1 en color verde, disminuye la supervivencia. Sin embargo, cuando los niveles del gen SAHH son bajos, considerado con el número 0 en color azul, la supervivencia se ve incrementada. No son resultados significativos, pero se puede observar cierta tendencia. Esto puede suceder debido a que los niveles de SAHH similares y al bajo número de casos.



**Gráfico 2.** Niveles de expresión del gen SAHH de los pacientes incluidos en el GEIS-20 (Fragmento).

**Tabla 6.** Características clínicas de los pacientes incluidos en GEIS-20.

<b>Pacientes (n=69)</b>	
<b>Género</b>	
Hombre	53.6 (37)
Mujer	46.4 (32)
<b>Edad (años)</b>	51 [20-72]
<b>Histología</b>	
Liposarcoma	18.8 (13)
Sarcoma pleomórfico indiferenciado	17.4 (12)
Haemangiopericitoma	4.3 (3)
Leiomiomasarcoma	31.9 (22)
Sarcoma Sinovial	4.3 (3)
Sarcoma Neurogénico	4.3 (3)
Fibrosarcoma	7.2 (5)
Sarcoma no clasificado	5.8 (4)
Sarcoma Fibromixioide	1.5 (1)
Angiosarcoma	1.5 (1)
Condrosarcoma	1.5 (1)
Otros	1.5 (1)
<b>Estadio</b>	
Localmente avanzado	23.2 (16)
Metastásico	76.8 (53)
<b>Tratamiento</b>	
Doxorrubicina 75 mg/m <sup>2</sup> 3w x 6 ciclos	50.7 (35)
Trabectedina 1.1 mg/m <sup>2</sup> + Doxorrubicina/ 3w 60 mg/m <sup>2</sup> 3w x 6 ciclos	

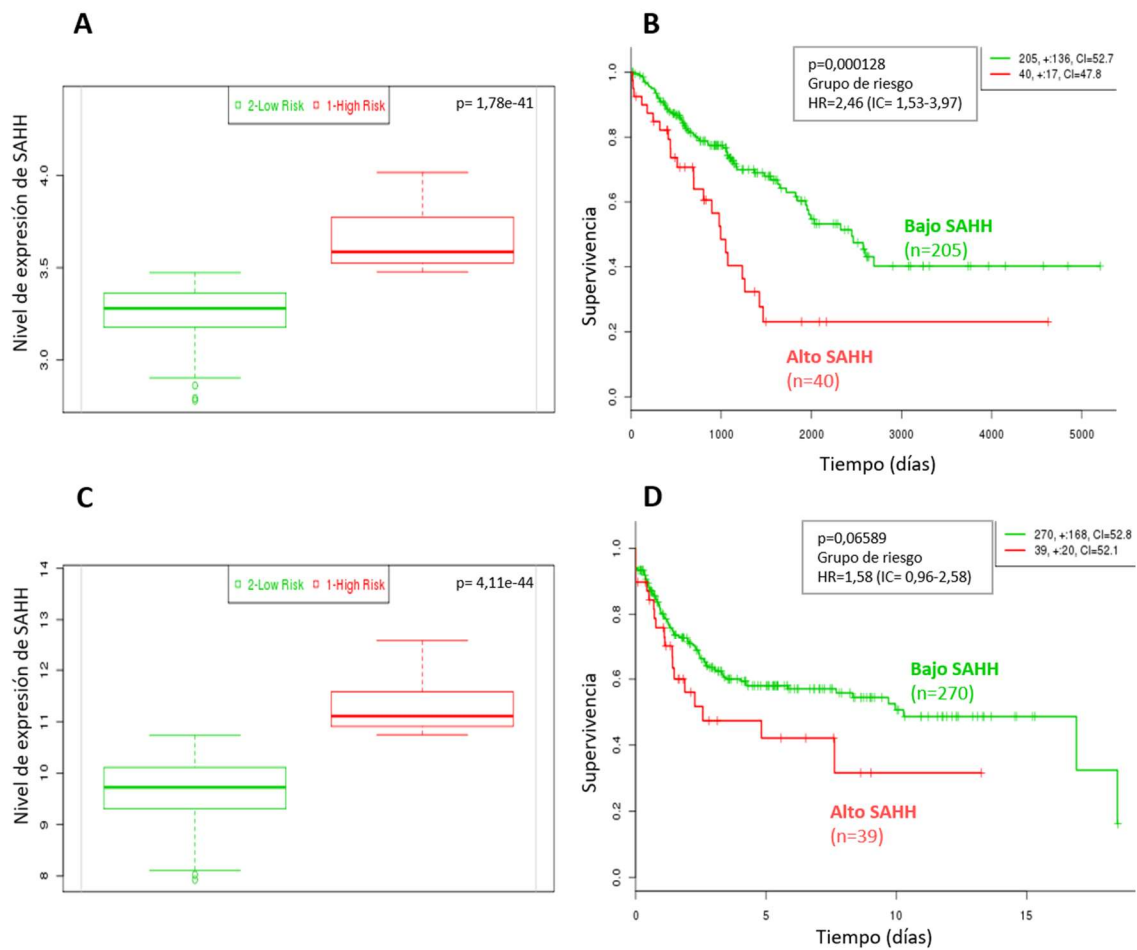


**Figura 6.** Relación entre la supervivencia acumulada y supervivencia libre de progresión (SLP) clasificando a los pacientes en alta (verde) y baja (azul) expresión del gen SAHH. **3A:** Categorización de los niveles atendiendo a la media. **3B:** Categorización de los niveles atendiendo a la mediana.

Para comprobar estos datos se realizaron estudios en 2 bases de datos distintas: TCGA (n=245) y GSE21050 (n=310). Ambas bases de datos tenían distintos subtipos de sarcomas y un número de pacientes más elevado, pero la separación por subtipos daba, en general, muy bajo número de pacientes para ser significativo. En ambas bases de datos se analizó la supervivencia general de acuerdo a los distintos niveles de la expresión de SAHH.

El análisis de los niveles de expresión de SAHH en la base de datos del TCGA, mostraba que los pacientes con mayores niveles del gen SAHH, tenían un riesgo más alto que los pacientes con expresión más baja (Figura 7A). La supervivencia de los pacientes con altos niveles de SAHH se veía disminuida y el número de pacientes con altos niveles de SAHH era reducido (Figura 7B). Esto está de acuerdo con lo obtenido en el estudio del GEIS-20.

Similares datos se obtuvieron al analizar la segunda cohorte (GSE21050). Los pacientes con altos niveles de expresión de SAHH mostraban un significativo peor pronóstico, mayor riesgo (Figura 7C). Cuando se analizó la supervivencia general se producía lo mismo que en el caso anterior, los pacientes con altos niveles de SAHH eran un número más reducido y la supervivencia de éstos era menor (Figura 7D).

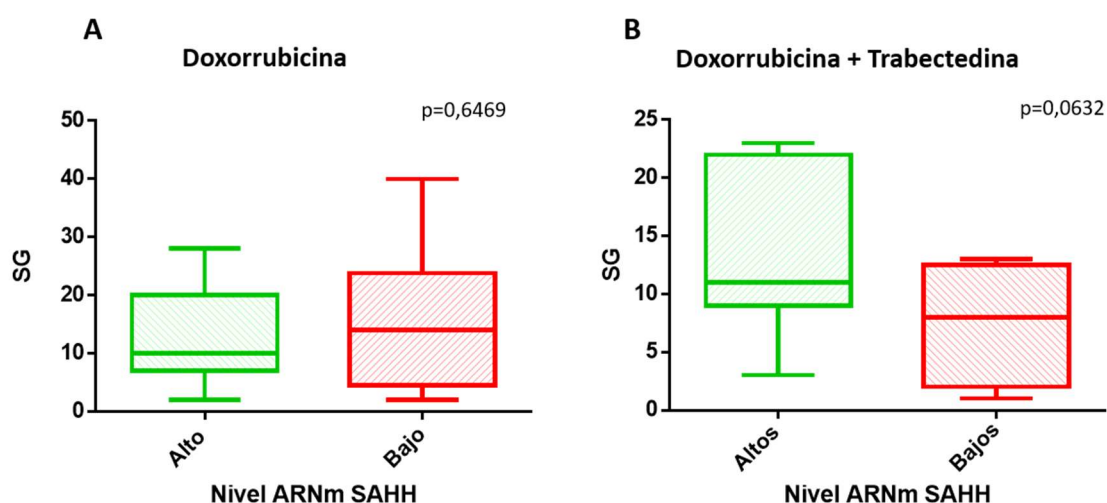


**Figura 7.** Análisis de la supervivencia general según nivel de expresión de SAHH. **7A:** Correlación entre los niveles de expresión de SAHH y el pronóstico de la enfermedad (TCGA). **7B:** Supervivencia de los pacientes divididos según el nivel de expresión de SAHH (TCGA). **7C:** Correlación entre los niveles de expresión de SAHH y el pronóstico de la enfermedad (GSE21050). **7D:** Supervivencia de los pacientes divididos según el nivel de expresión de SAHH (GSE21050).

Como los resultados anteriores revelaban que había una relación entre los niveles del gen SAHH y la supervivencia global de los pacientes con sarcoma, se propuso un análisis estadístico t-student entre los niveles de ARNm de SAHH y la supervivencia global de los pacientes teniendo en cuenta el tratamiento que habían recibido éstos.

En los pacientes tratados solo con doxorubicina en la cohorte del grupo GEIS 20, no se obtuvo una correlación de Pearson significativa (Figura 8A). Sin embargo, en la figura 8B se puede observar una tendencia positiva en los pacientes tratados con doxorubicina y trabectedina. Esto quiere decir que los pacientes con niveles elevados de SAHH tenían una mayor supervivencia global cuando eran tratados con trabectedina. Dicho resultado se puede explicar teniendo en cuenta el mecanismo de acción que viene reflejado en la ficha técnica de este fármaco ya que provoca la alteración de la transcripción y reparación del ADN. Por lo tanto, actúa retardando la fase S (síntesis de ADN) y deteniendo el ciclo celular en G2/M, induciendo apoptosis.

Estos datos sugieren que los tumores con altos niveles de SAHH indican un peor pronóstico de supervivencia en pacientes de sarcoma, sobre todo si han sido tratados con doxorubicina como único tratamiento. Por lo tanto, la siguiente etapa consistió en buscar una manera de sensibilizar estos tumores para que fueran susceptibles a doxorubicina.



**Figura 8.** Correlación entre la supervivencia global y la expresión de SAHH de los pacientes según el tratamiento. **8A:** Pacientes tratados exclusivamente con doxorubicina. **8B:** Pacientes tratados con doxorubicina y trabectedina.



#### 4.2 Sensibilidad a diversos fármacos en líneas celulares de sarcoma

Se realizó el ensayo IC50 con doxorubicina para las 13 líneas celulares de sarcoma. Para ello, se hicieron al menos dos experimentos distintos realizados en triplicados independientes. Posteriormente, se calculó la media aritmética de ambos experimentos y la desviación estándar. Un ejemplo de una curva dosis respuesta puede observarse en la figura 9.

El IC50 de doxorubicina de las líneas celulares de sarcoma van desde 25 nM hasta 411 nM (tabla 7). Esto concuerda con el IC50 de este fármaco obtenido en otros artículos como Perez, 2017. El IC50 de camptotecina tiene valores desde 13,54 nM hasta 100 nM. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico t-student empleando la división de las líneas celulares de sarcoma por alta y baja expresión de SAHH y el IC50 de doxorubicina y camptotecina respectivamente (Tabla 8).

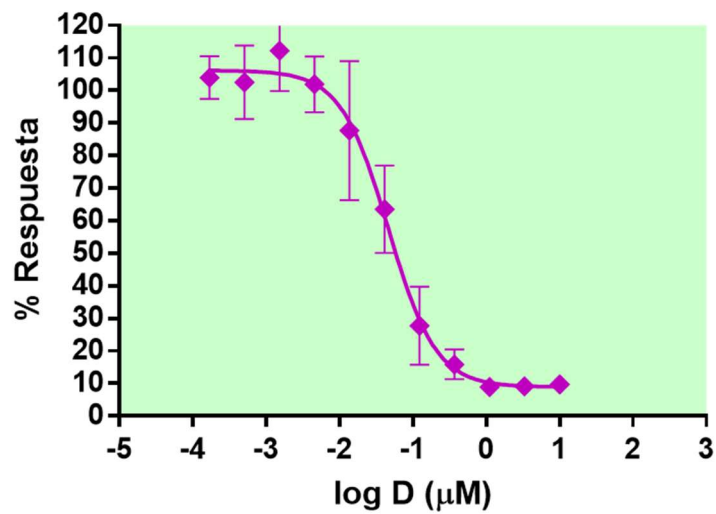


Figura 9. Curva dosis – respuesta de la línea 93T449

**Tabla 7.** IC 50 a doxorubicina y camptotecina de las líneas celulares de sarcoma divididas según el nivel de expresión de SAHH.

Líneas	IC50 Doxorubicina (nM) ± SD *	IC50 Camptotecina (nM) &	
AZ	397,3 ± 40.9	50	<b>Baja expresión de SAHH</b>
BG	125,94 ± 48,29	13,54	
AW	106,34 ± 11,8	30,8	
BC	74,14 ± 6,29	24,5	
CE	411,13 ± 106,2	50	
AX	42,96 ± 7,72	18,9	
93T449	43,32 ± 17,68	ND	
AA	69,66 ± 14,4	17,7	
SAOS 2	51,92 ± 3,63	100	<b>Alta expresión de SAHH</b>
A673	25,95 ± 0,9	50	
SKUT1	105,3 ± 11,6	ND	
SW872	69,61 ± 9	14,2	
CP0024	296,2 ± 73.53	ND	

\* Media de 3 experimentos independientes realizados por cuatuplicados independientes.

& Media de 3 experimentos independientes realizados por triplicados independientes. No se muestra la SD.

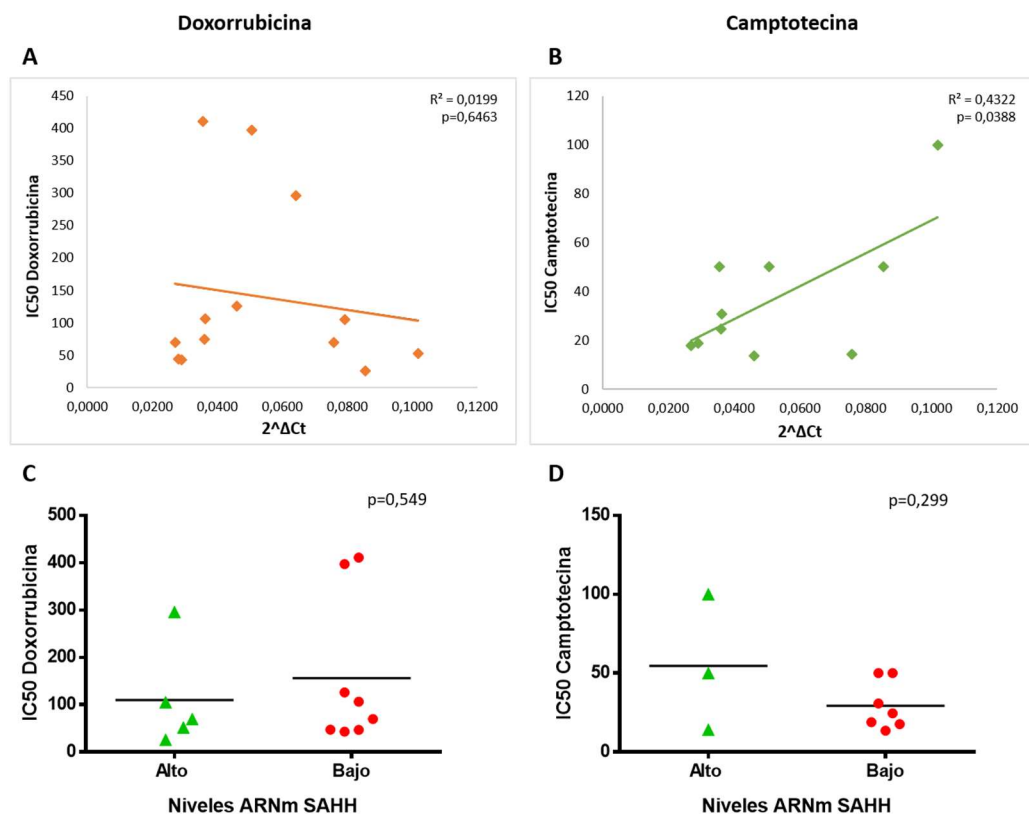
En primer lugar, al realizar el análisis estadístico t-student y el diagrama de dispersión entre los niveles de ARNm de SAHH de las líneas celulares y el IC50 a doxorubicina, no se observó que existieran diferencias significativas (Figura 10A y 10C). Por ello, no se puede establecer una correlación entre los niveles de expresión de SAHH y la citotoxicidad de doxorubicina. La no correlación se puede deber al reducido número de muestras o a la poca diferencia entre los niveles de ARNm de SAHH de las líneas celulares.

Por otro lado, cuando se realizó el análisis estadístico t- student entre los niveles de expresión de SAHH de las líneas celulares y el IC50 a camptotecina no se observaron diferencias significativas (Figura 10D). Sin embargo, al realizar el diagrama de dispersión y calcular el coeficiente de correlación de Pearson, se obtuvo una relación entre dichos niveles y el IC50 a camptotecina (Figura 10B). Esto refleja que el aumento de la expresión de SAHH provoca el incremento del IC50 de este fármaco, es decir, disminuye la sensibilidad a camptotecina.

El significado que representan estos resultados son que, cuanto mayor es el nivel de expresión de SAHH, peor es la respuesta al fármaco. La camptotecina actúa

inhibiendo a topoisomerasa I, enzima que se encarga de la rotura transitoria del ADN en una sola hebra para reducir las tensiones provocadas por el superenrollamiento interno de éste, impidiendo la síntesis de ADN. Por lo tanto, teniendo en cuenta que SAHH cataliza reacciones que intervienen en la metilación de ADN, si disminuye la metilación de ADN debido a niveles bajos de este gen, el ADN se encontrará más accesible para la acción de camptotecina. Esto provocaría más fácilmente la muerte celular.

Estudios recientes en cáncer colorrectal demuestran que la hipometilación del ADN mejora la sensibilidad a irinotecán, profármaco derivado de la camptotecina. SAHH está implicado en la metilación del ADN por lo que la disminución de esta enzima provocaría la hipometilación del ADN. Por tanto, estos datos estarían de acuerdo con los resultados anteriormente obtenidos (Sharma et al., 2017).



**Figura 10.** Correlación entre los niveles de expresión de SAHH y IC50 a doxorubicina y camptotecina. **10A:** Diagrama de dispersión de doxorubicina. **10B:** Diagrama de dispersión de camptotecina. **10C:** Diagrama de caja de IC50 a doxorubicina dividiendo las líneas celulares en alto y bajo nivel de expresión de SAHH. **10D:** Diagrama de caja de IC50 a camptotecina dividiendo las líneas celulares en alto y bajo nivel de expresión de SAHH.

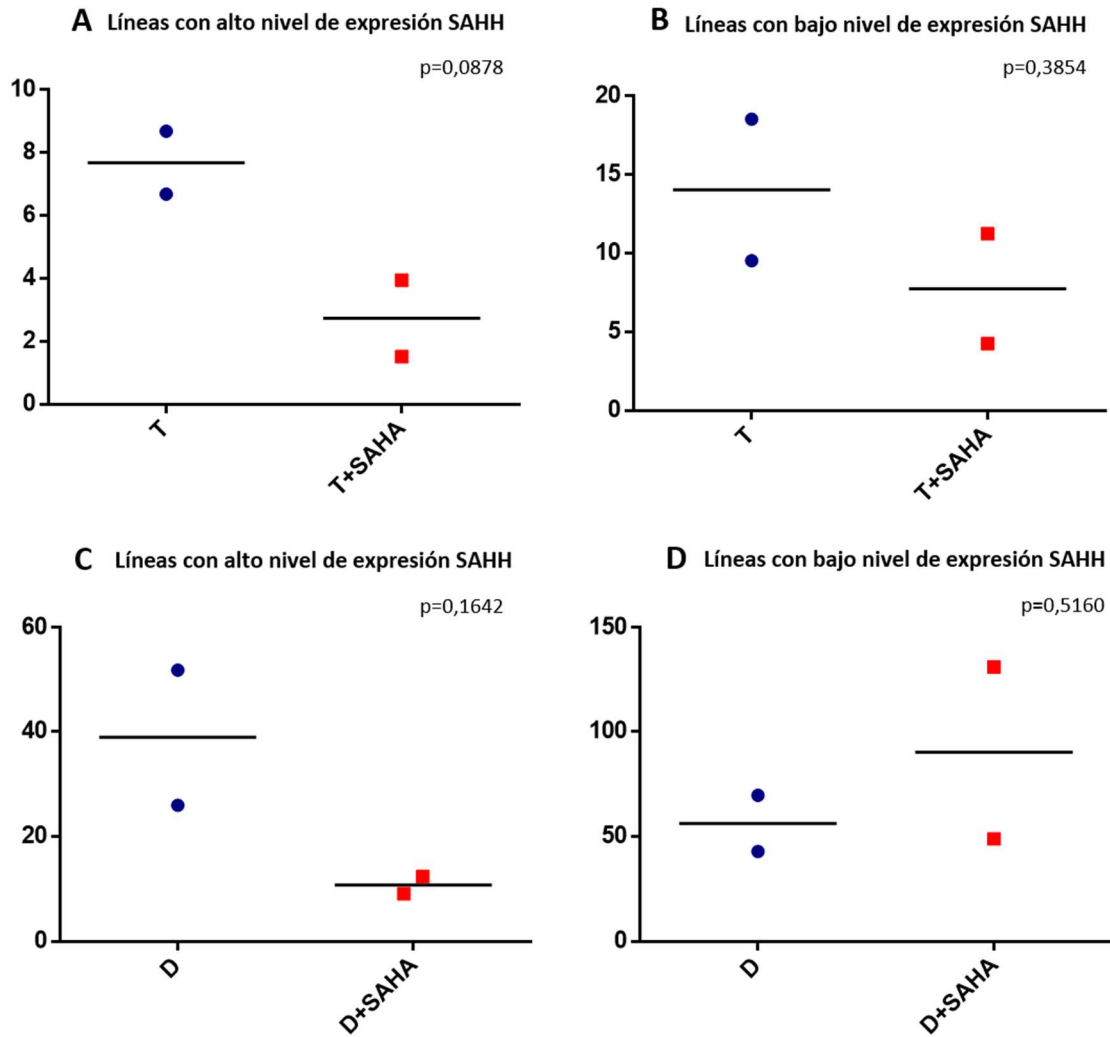
Para corroborar estos resultados, se realizaron IC50 a las líneas con mayor y menor nivel de ARNm de SAHH para doxorubicina y camptotecina adicionando la misma cantidad de SAHA (Ácido hidroxámico suberoilánilida).

En este caso, se empleó topotecán, fármaco derivado de camptotecina, ya que es el que se emplea actualmente en clínica para tratar diversos tipos de cáncer (cáncer de ovario, pulmón y cuello uterino). Topotecán se obtuvo mediante modificaciones químicas a partir de camptotecina para incrementar la eficacia y disminuir la toxicidad.

SAHA es un agente desmetilante que actúa como inhibidor de la histona desacetilasa y eso da lugar a la hipometilación del ADN (Kirschbaum et al., 2011). Dicho medicamento se usa para tratar el linfoma cutáneo de células T que no mejora, empeora o reincide durante el tratamiento con otros medicamentos, como se muestra en la ficha técnica del medicamento. También se denomina vorinostat, y Zolinza.

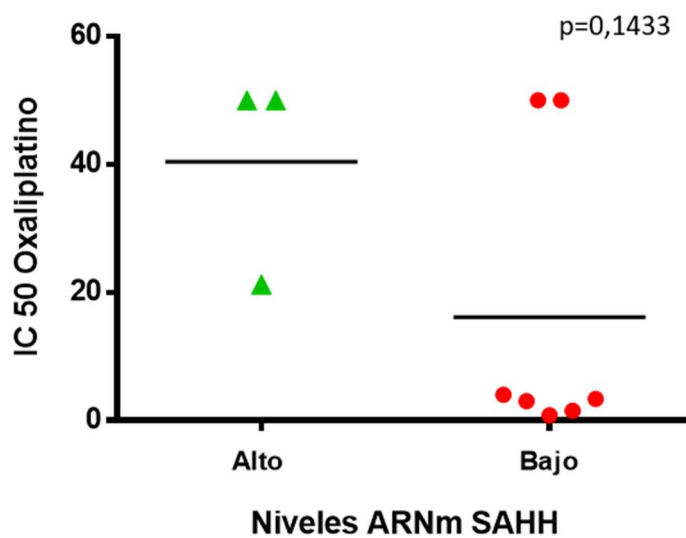
Se observa una tendencia en la mejora de la respuesta cuando las líneas con alta expresión de SAHH son tratadas conjuntamente con topotecán o doxorubicina y SAHA (Figura 11A y 11C). Por lo que SAHA podría estar inhibiendo a SAHH. Esto tiene una mejor significancia cuando son tratadas con topotecán ya que existía una correlación positiva entre el IC50 de topotecán y el nivel de expresión de SAHH.

Las líneas con baja expresión de SAHH (Figura 11B y 11D), no mejoran la respuesta de manera significativa al ser tratadas con topotecán o doxorubicina y SAHA. Esto se puede deber a que SAHH ya se encuentra en baja proporción y, por tanto, la inhibición que ejerce SAHA sobre el efecto de SAHH es en menor proporción.



**Figura 11.** Correlación de las líneas dependiendo del nivel de expresión de SAHH al ser tratadas con diferentes fármacos. **11A:** Líneas con alto nivel de expresión de SAHH al ser tratadas con topotecán (T) y topotecán más SAHA (T+SAHA). **11B:** Líneas con bajo nivel de expresión de SAHH al ser tratadas con topotecán (T) y topotecán más SAHA (T+SAHA). **11C:** Líneas con alto nivel de expresión de SAHH al ser tratadas con doxorubicina (D) y doxorubicina más SAHA (D+SAHA). **11D:** Líneas con bajo nivel de expresión de SAHH al ser tratadas con doxorubicina (D) y doxorubicina más SAHA (D+SAHA).

Además, en el análisis de otros fármacos también se pudo apreciar una tendencia positiva y negativa, respectivamente, de los fármacos oxaliplatino ( $r=0,49$ ) y flavop ( $r=-0,47$ ) en relación a los niveles de SAHH. La correlación negativa de flavop quiere decir que al aumentar los niveles de expresión de SAHH aumenta la sensibilidad al fármaco. El oxaliplatino, mostraba una tendencia positiva, es decir, la respuesta de este fármaco se podría predecir conociendo los niveles de SAHH. Por tanto, cuando los niveles de SAHH son elevados, disminuye la sensibilidad al fármaco (gráfico 3).



**Gráfico 3.** Relación entre alta y baja expresión de SAHH ARNm e IC50 de oxaliplatino de las diferentes líneas celulares.

### 4.3 Relación entre SAHH y otros genes

Se buscó la relación que SAHH podría tener con otros genes mediante el análisis en R2: Genomics Analysis and Visualization Platform.

Se descubrió que los genes más relacionados con SAHH eran los de membrana ( $p= 1.7e-03$ ) y represores transcripcionales ( $p= 2.4e-03$ ).

TRIM28 es uno de los genes que intervienen en la represión transcripcional que están bastante relacionados con SAHH.

Como se puede observar en la figura 12A, TRIM28 tiene una correlación positiva con SAHH, esto significa que cuando los niveles de uno de ellos aumentan, se incrementa la del otro también.

TRIM28 es una proteína denominada motivo tripartito 28, también conocida como factor intermediario transcripcional  $1\beta$ . Esta proteína está implicada en la regulación transcripcional y se encuentra en el núcleo celular asociada con regiones específicas de la cromatina. Durante mucho tiempo se ha estudiado su implicación en el cáncer y estudios recientes demuestran que la sobreexpresión de TRIM28 contribuye en la progresión del cáncer y la metástasis (Czerwińska et al., 2017). La disminución de supervivencia teniendo en cuenta el incremento de los niveles de SAHH, se demostraron en la figura 6A y, posteriormente, comprobado en otras bases de datos (Figura 6).

En ese mismo estudio, se observó que TRIM28 podría actuar como factor antitumorigénico ya que una de las funciones principales es proteger la integridad del genoma evitando el daño en el ADN y el desarrollo del cáncer. Si existe una correlación positiva con SAHH, éste debería de actuar de forma similar. Esto se demostró en un estudio en el que se compararon los niveles de SAHH en tumores humanos y tejido normal, perdiendo un 50% la expresión de SAHH en tumores humanos, por lo que podría actuar de la misma forma (Leal et al., 2008a).

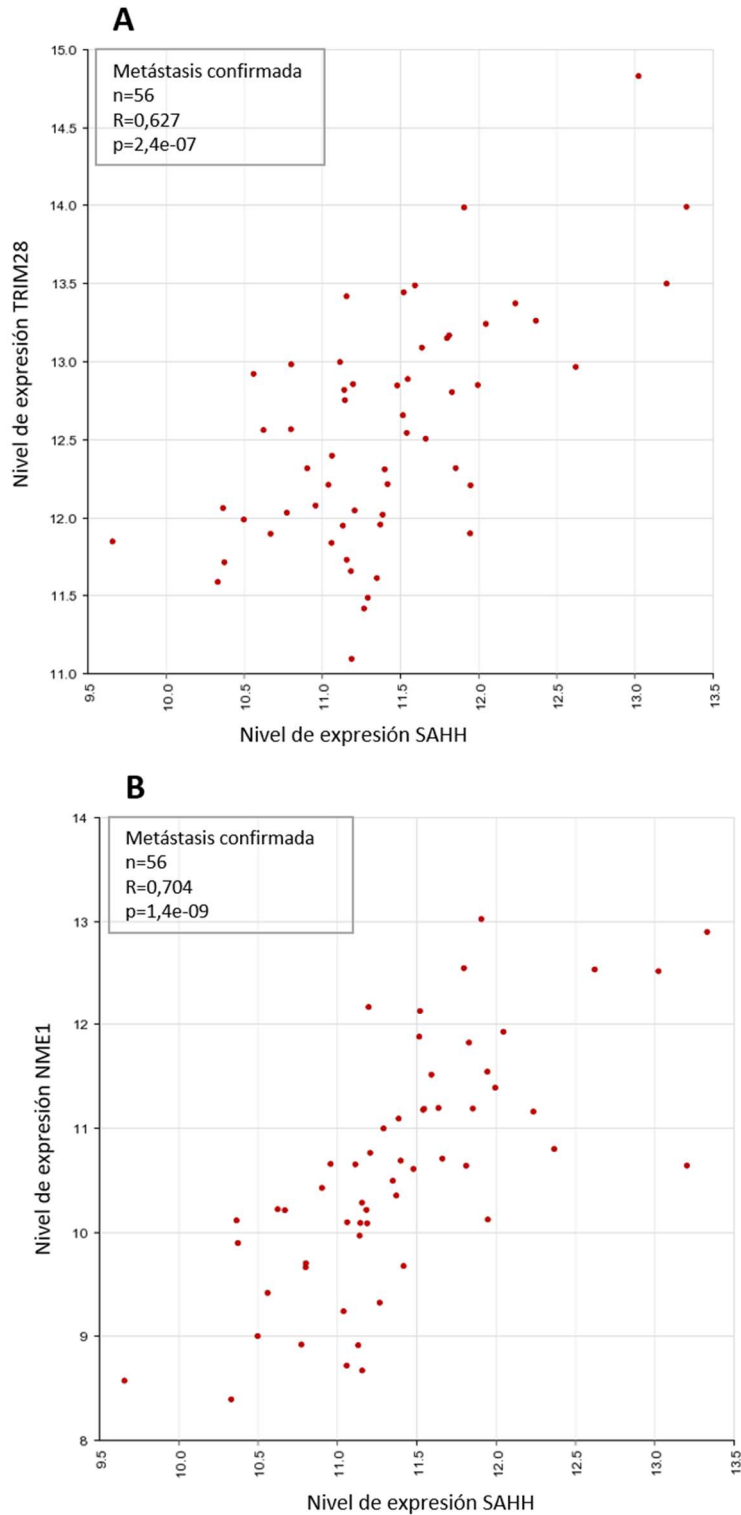
Por tanto, SAHH y TRIM28 pueden actuar como factores antitumorigénicos antes del desarrollo del cáncer y promover la progresión del cáncer y metástasis cuando ya se ha instaurado la enfermedad.

Otro de los genes relacionado con SAHH es NME1 que regula la apoptosis y el ciclo celular.

Este gen también denominado NM23 es el nucleósido difosfato quinasa 1. Se piensa que es un gen supresor de metástasis ya que se ha comprobado la reducción de los niveles de ARNm de NME1 en células metastásicas. El papel principal de NME1 es la síntesis de nucleósidos trifosfatos distintos de ATP (Carotenuto et al., 2013).

Como se puede observar en la figura 12B, existe una correlación positiva entre los niveles de NME1 y SAHH en pacientes con sarcoma donde la metástasis está confirmada. Es decir, SAHH podría actuar como gen supresor de metástasis en algún subtipo de sarcoma, pero no se ha podido comprobar en este trabajo.





**Figura 12.** Relación de SAHH con otros genes en pacientes con sarcoma y metástasis confirmada (Base de datos TCGA). **12A:** Correlación entre los niveles de expresión de SAHH y TRIM 28. **12B:** Correlación entre los niveles de expresión de SAHH y NME1.

## 5. Conclusiones

- Altos niveles de expresión de SAHH conducen a una disminución en la supervivencia en pacientes con sarcoma.
- Hay una tendencia en la mejora de la supervivencia global cuando los pacientes con elevados niveles de expresión de SAHH son tratados con doxorubicina como primera línea y, posteriormente, con trabectedina, a diferencia del tratamiento único con doxorubicina.
- Se ha observado la existencia de una correlación de Pearson positiva entre los niveles de expresión de SAHH y la resistencia a camptotecina. Cuando aumentan dichos niveles, empeora la respuesta a este fármaco.
- Por último, el tratamiento conjunto de topotecán, derivado de camptotecina, y SAHA, inhibidor de la metilación, provoca el incremento en la sensibilidad a topotecán.

## 6. Bibliografía

Basler G, Nikoloski Z, Larhlimi A, Barabási AL, Liu YY. Control of fluxes in metabolic networks. *Genome Res* 2016;26:956–68. doi:10.1101/gr.202648.115.

Carotenuto M, Pedone E, Diana D, De Antonellis P, Džeroski S, Marino N, et al. Neuroblastoma tumorigenesis is regulated through the Nm23-H1/h-Prune C-terminal interaction. *Sci Rep* 2013;3:1–11. doi:10.1038/srep01351.

Czerwińska P, Mazurek S, Wiznerowicz M. The complexity of TRIM28 contribution to cancer. *J Biomed Sci* 2017;24:1–14. doi:10.1186/s12929-017-0374-4.

Elmore LW, Rehder CW, Di X, McChesney PA, Jackson-Cook CK, Gewirtz DA, et al. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem* 2002;277:35509–15. doi:10.1074/jbc.M205477200.

GIBSON KD, WILSON JD, UDENFRIEND S. The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *J Biol Chem* 1961;236:673–9.

Travieso Y, Mustelier P, Martínez Z, Posada A. Aspectos relevantes de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa relacionados con el metabolismo de la S-adenosilhomocisteína. *Rev Cuba Investig Biomed* 2006;25(2).

Hinshelwood RA, Huschtscha LI, Melki J, Stirzaker C, Abdipranoto A, Vissel B, et al. Concordant Epigenetic Silencing of Transforming Growth Factor- Signaling Pathway Genes Occurs Early in Breast Carcinogenesis. *Cancer Res* 2007;67:11517–27. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1284.

HYCAMTIN®. Ficha Técnica del medicamento. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). <https://www.aemps.gob.es/cima/>

Kirschbaum M, Frankel P, Popplewell L, Zain J, Delioukina M, Pullarkat V, et al. Phase II study of vorinostat for treatment of relapsed or refractory indolent non-hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2011;29:1198–203. doi:10.1200/JCO.2010.32.1398.

Leal JF, Ferrer I, Blanco-Aparicio C, Hernández-Losa J, Ramón y Cajal S, Carnero A, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2008;29:2089–95. doi:10.1093/carcin/bgn198.

Leal JFM, Fominaya J, Cascón A, Guijarro M V., Blanco-Aparicio C, Leonart M, et al. Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes. *Oncogene* 2008;27:1961–70. doi:10.1038/sj.onc.1210846.

Moneo MV. Generación de herramientas celulares para validación preclínica de compuestos anti –tumoraes. [Tesis doctoral]. Madrid: Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid; 2009.

Narita M, Lowe SW. Senescence comes of age. *Nat Med* 2005; 11:920.

Perez M. Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes como modelos para la búsqueda de biomarcadores de sensibilidad a fármacos. [Tesis doctoral]. Sevilla: Instituto de Biomedicina de Sevilla, Universidad de Sevilla; 2017.

Radomski N, Barreto G, Kaufmann C, Yokoska J, Mizumoto K, Dreyer C. Interaction of S-adenosylhomocysteine hydrolase of *Xenopus laevis* with mRNA(guanine-7)methyltransferase: Implication on its nuclear compartmentalisation and on cap methylation of hnRNA. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2002;1590:93–102. doi:10.1016/S0167-4889(02)00205-7.

Sharma A, Vatapalli R, Abdelfatah E, McMahon KW, Kerner Z, Guzzetta AA, et al. Hypomethylating agents synergize with irinotecan to improve response to chemotherapy in colorectal cancer cells. *PLoS One* 2017;12:1–15. doi:10.1371/journal.pone.0176139.

ZOLINZA®. Ficha técnica del medicamento. Food and Drug Administration (FDA) (EMA). <https://www.fda.gov/>

Walker NJ. A Technique Whose Time Has Come. *Science* (80- ) 2002;296:557 LP-559.

Yondelis®. Ficha técnica del medicamento. Agencia Europea de Medicamentos (EMA). <http://www.ema.europa.eu>