

ESTUDIO DE FÁRMACOS INHIBIDORES DE AUTOFAGIA Y EPIGENÉTICOS EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Study of Autophagy Inhibitors and Epigenetic Drugs within a Cellular Line of Prostate Cancer

Carmen SÁNCHEZ ARROYO; Rogelio GONZÁLEZ SARMIENTO

Centro de investigación del Cáncer (CIC). Laboratorio 14. Campus Miguel de Unamuno. Salamanca. Tel.: 637054833

Correo-e: carmensa9@hotmail.com

RESUMEN: El control de la epigenética y la autofagia tiene un papel importante en el cáncer de próstata. Por un lado, el impacto de las modificaciones epigenéticas está implicado en la proliferación, diferenciación y supervivencia tumoral. Panobinostat es un potente inhibidor de pan-deacetilasas capaz de revertir cambios epigenéticos implicados en la progresión tumoral; por otro lado, el control de la autofagia en las etapas iniciales inhibe la tumorigénesis confiriendo funciones antioncogénicas, sin embargo, en las etapas finales promueve las metástasis y la resistencia a la quimioterapia. Cloroquina es un antimalárico cuyo efecto como anti-neoplásico está siendo estudiado, ya que inhibe la autofagia. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto citotóxico de Cloroquina y Panobinostat en la línea celular prostática VCAP mediante el ensayo MTT y analizar el efecto de los fármacos, tanto individual como sinérgico, sobre el ciclo celular. Los resultados obtenidos muestran que el uso de ambos fármacos causa un efecto antitumoral en VCAP, siendo destacable Panobinostat; y que, el efecto sinérgico es un esquema muy potente causando muerte en la mayoría de las células tumorales. En conclusión, podrían ser una nueva estrategia de tratamiento en pacientes diagnosticados con cáncer de próstata.

Palabras clave: autofagia; Cloroquina; epigenética; Panobinostat; cáncer de próstata.

ABSTRACT: Regulation of epigenetic and autophagy has an important role in prostate cancer. On the one hand, the impact of epigenetic modifications is engaged in proliferation, distinction and tumors survival. Panobinostat is an intense pan-deacetylases inhibitor which can reverse epigenetic changes involved in tumour development. On the other hand, autophagy in starting phases inhibits tumorigenesis endowing anti-oncogenic functions. Nonetheless, in ending phases, spreads metastasis and chemotherapy tolerance. Chloroquine is an antimalarial, it has an antineoplastic effect which is being studying due to its autophagy inhibition. The aim of this project is to assess the cytotoxic effect of Chloroquine and Panobinostat over prostate cellular line VCAP through MTT assay, and analyse the effect of drugs, covering both; concrete and synergistic, over the cellular cycle. Because of the results obtained, it is shown that both drugs cause an antitumor effect in VCAP, being important to point out Panobinostat; it has also been shown that powerful synergetic effect is responsible of death of most cells tumour. To conclude, it would be a good treatment in patients who have been diagnosed with prostate cancer

Key words: Autophagy; Chloroquine; Epigenetic; Panobinostat; Prostate cancer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Cáncer de próstata*

En los últimos años, el cáncer de próstata se ha convertido en un problema de interés general para la salud pública debido a su aumento a nivel mundial. Según la *Sociedad Española de Oncología Médica*, a través del Informe GLOBOCAN 2012, el cáncer de próstata es el tumor de mayor prevalencia en varones, tanto en España (31%) como globalmente (25%), con una incidencia del 21.7%, siendo el segundo cáncer más frecuente en España.

Los esquemas generales de tratamiento se pueden clasificar según el estadio del tumor. Para los estadios iniciales (I-III) el tratamiento de elección incluye la radioterapia y la cirugía y si nos encontramos ante fases más avanzadas (III-IV) el esquema más utilizado es la terapia hormonal, combinada en muchos casos con quimioterapia y/o inmunoterapia (Vaissière *et al.*, 2008).

1.2. *Epigenética*

Epigenética y cáncer

La epigenética se define como aquellas alteraciones heredables en la expresión génica y en la cromatina que no afectan a la secuencia de ADN.

Los principales mecanismos epigenéticos son: 1) metilación del ADN, 2) modificaciones postraduccionales de histonas y 3) silenciamiento génico mediante MicroRNA o ARN no codificante.

En este trabajo nos centraremos en la acetilación de histonas, proceso de modificación postraducional que suele ocurrir en el extremo N-terminal con intervención de las enzimas histonas acetil-transferasas (HATs) y deacetilasas (HDACs). Su función determina la condensación de la cromatina, de manera que un estado hipoacetilado da lugar al silenciamiento génico (Yen C-Y *et al.*, 2016).

El impacto de las modificaciones epigenéticas está implicado en la proliferación, la diferenciación y la supervivencia tumoral. De este modo, los cambios epigenéticos que causan una disregulación transcripcional dan lugar a una expresión inadecuada, a la activación de factores de transcripción asociados a oncogenes y a la represión en la expresión de genes supresores de tumores (Hardy, Tollefsbol, 2011).

Panobinostat como inhibidor de HDAC

Panobinostat (LBH589) es un potente inhibidor de pan-deacetilasas, ya que puede bloquear múltiples vías relacionadas con el desarrollo tumoral y revertir cambios epigenéticos implicados en la progresión (Sharma *et al.*, 2015). Su mecanismo conduce a la apoptosis de células malignas mediante diferentes procedimientos.

Se conoce que el aumento de la expresión de HDACs es una de las aberraciones más comunes en el cáncer de próstata, por lo que la inhibición de estas es una de las nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento (Ellis *et al.*, 2013).

1.3. *Autofagia*

Autofagia y cáncer

La autofagia es un proceso de autodegradación de componentes celulares presente en eucariotas, en el cual los autofagosomas de doble membrana secuestran

orgánulos o porciones del citosol y se fusionan con lisosomas o vacuolas para ser degradados por hidrolasas ácidas, facilitando la utilización de nutrientes básicos para continuar con la proliferación celular (He, 2009).

Está regulada en respuesta a señales intra o extracelulares como el estrés, la falta de nutrientes o la infección por patógenos. Una alteración en este proceso de homeostasis celular juega un papel importante en la aparición de enfermedades entre las que se incluye el cáncer (Mizushima *et al.*, 2008).

Hay dos enlaces con esta enfermedad: uno en las primeras etapas del desarrollo, donde el control de la autofagia, particularmente sobre el mantenimiento del genoma, inhibe la tumorigénesis, confiriéndole funciones antioncogénicas. Así, la autofagia podría coordinar el mantenimiento o entrada de las células en fase G0 y, en consecuencia, prevenir la hiperproliferación espontánea. Y otro, centrado en el tratamiento: en las últimas etapas del cáncer, la autofagia puede ayudar a las células tumorales sometidas al estrés metabólico resistiendo la muerte desencadenada por quimioterápicos (Arroyo *et al.*, 2014).

Cloroquina como inhibidor de autofagia

La Cloroquina ha sido usada desde su descubrimiento en 1934 como antimalárico y antirreumático.

La importancia de la Cloroquina como antineoplásico está siendo estudiada tanto *in vitro* como *in vivo* actuando como un inhibidor de la autofagia en el último paso (Kimmelman, 2011). Aun así, se considera un sensibilizador de la quimioterapia más que un antineoplásico.

El mecanismo de acción por el cual ejerce dicho efecto se basa en su acumulación dentro del lisosoma modificando la permeabilidad de la membrana lisosomal, liberando enzimas proteolíticas que inducen daños celulares, que finalmente conducirán a la apoptosis (Figura 1). Este fármaco ha demostrado estabilizar el p53 y la detención del ciclo celular, así como el bloqueo de la familia de transportadores ABC (ATP binding protein), responsable de la expulsión de fármacos al exterior de la célula (Zhang *et al.*, 2015).

Tomados en conjunto, parece que la eficacia de las terapias convencionales contra el cáncer se puede mejorar drásticamente si se utilizan en combinación con Cloroquina y sus análogos.

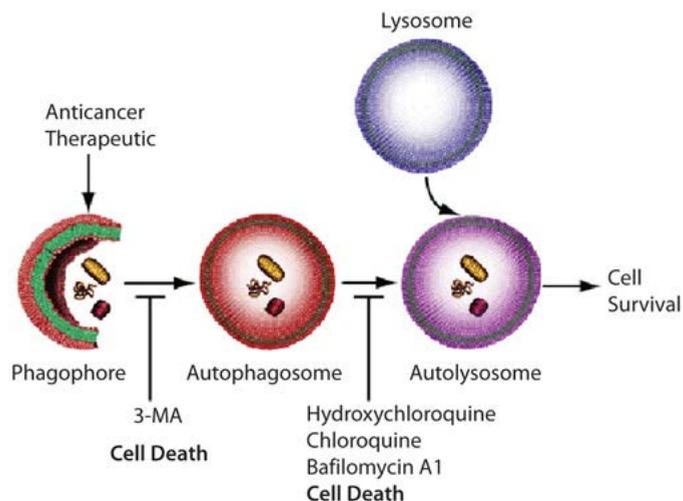


FIGURA 1. Mecanismo de acción de la Cloroquina como inhibidor de autofagia.
(Stephenson 2013)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La combinación de fármacos epigenéticos e inhibidores de la autofagia es útil en el tratamiento de cáncer de próstata.

Por ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de Cloroquina y Panobinostat sobre la viabilidad de línea celular VCAP, determinando la concentración mínima eficaz para detener el crecimiento de las células tumorales.
- Analizar el efecto individual de los fármacos en el ciclo celular de la línea celular de cáncer de próstata VCAP.
- Estudiar el efecto sinérgico entre Cloroquina y Panobinostat sobre el ciclo celular.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

a) Cultivos celulares

Estudiaremos una línea derivada de un adenocarcinoma de próstata VCAP, obtenida de ATCC (American Type Culture Collection. Rockville, MA, USA).

Las células se cultivaron en el medio DMEM (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) complementado con 10% FBS (suero fetal bovino) (*Sigma, St Louis, MO, USA*), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (*Invitrogen*). Se mantuvieron en un incubador a 37°C al 5% de CO₂.

b) Tratamiento

i. MTT

El ensayo MTT analiza la viabilidad celular, es decir, el crecimiento y la supervivencia celular dependiendo de las concentraciones del fármaco en estudio. En nuestro caso, estudiamos la proliferación celular de VCAP frente a Cloroquina y LBH (Figura 2).

Para cada fármaco, las concentraciones utilizadas en este ensayo fueron las siguientes:

- Cloroquina (procedencia Novartis. Basel, Switzerland): 25µM, 50µM, 75µM, 100µM, 125µM y 150µM
- Panobinostat (Ref. C6628. Sigma-Aldrich): 5nM, 10nM, 25nM y 75nM.

El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difentiltetrazolio) es un compuesto que ante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) se reduce a formazán, un compuesto hidrófobo de color azul. Esta sal se solubiliza con DMSO pudiendo ver el porcentaje de supervivencia, ya que el número de células vivas es proporcional al formazán producido.

Para cada fármaco, usamos 4 placas de 24 pocillos relacionados con el tiempo: 0, 24, 48 y 72h. La placa de 0h sin fármaco es el control. El primer día se cultivaron 10.000 células/pocillo y se dejaron incubar a 37°C durante 24h.

Tras los tiempos indicados, se añade 110µL de MTT en todos los pocillos excepto en los tres primeros (utilizado como blanco para cada uno de los experimentos), y se deja incubando la placa 1h a 37°C.

Pasada la hora, se aspira el sobrenadante cuidadosamente, y se añade 1mL de DMSO en cada pocillo para solubilizar los cristales.

Por último, con un lector de microplacas UltraEvolution (Tecan®) se mide la absorbancia a 570nm y se pasan los datos a través de Xfluo4® para determinar % de supervivencia.

ii. Citometría de flujo

Esta técnica nos permite analizar la distribución en cada una de las fases de ciclo celular.

Se estudió la línea celular VCAP tratada con Cloroquina 25 μ M y Panobinostat 50nM por separado, y posteriormente se estudió el efecto sinérgico.

Tomamos un tiempo 0 como control, y realizamos el tratamiento a 24, 48 y 72h. Luego, tripsinizamos las células y las recogemos con PBS. Centrifugamos 3' 1200rpm. Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el *pellet* en etanol frío al 70%.

Para la medición por inmunocitometría se procede al marcaje de las células con el fluorocromo yoduro de propidio (PI). Comenzamos lavando con PBS tres veces y añadimos RNAsa y PI, que, al intercalarse en el ADN, permite analizar las fases del ciclo celular en las que se encuentran las células, de manera que la cantidad de PI es proporcional a la cantidad de ADN. Tras 1h a temperatura ambiente en oscuridad se analizan las muestras en un citómetro FACSCalibur (programa Cell Quest Pro). Para analizar los resultados se utilizó WinMDI, que nos cuantifica las células en cada estadio del ciclo.

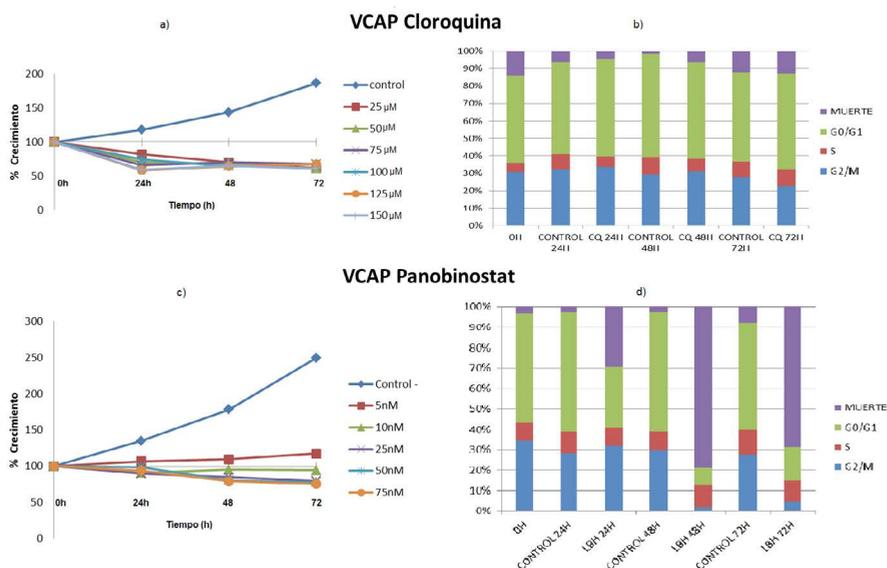


FIGURA 2. Efecto de los tratamientos sobre la línea celular VCAP. 2a) Ensayo MTT con Cloroquina 2b) Citometría de flujo con Cloroquina 2c) Ensayo MTT con Panobinostat 2d) Citometría de flujo con Panobinostat.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de Cloroquina sobre la proliferación de la línea celular VCAP

Una vez obtenidos los datos de absorbancia del MTT se calculó la tasa proliferativa (%) con cada una de las dosis estudiadas (Figura 2A).

Comparando el crecimiento celular exponencial que ocurre en el control, sin fármaco, vemos que las células tratadas a partir de 25µM presentan disminución en la proliferación, y que, a medida que aumenta la concentración, mayor es dicha disminución. Por lo que podemos concluir que 25µM es la concentración mínima inhibitoria siendo ya citotóxica, y debido a esto, la usamos para analizar la distribución del ciclo celular mediante citometría (Figura 2B), técnica con la cual vemos que la mortalidad aumenta a medida que aumenta el tiempo de exposición al fármaco, siendo el máximo a las 72h (12%). Aun así, no hay diferencias significativas en cuanto al % de células que existen en cada una de las fases de la división respecto al control.

Debido a la moderada mortalidad que Cloroquina causa en VCAP a pesar de inhibir el crecimiento a partir de 25µM, podemos afirmar su baja eficacia como agente antineoplásico cuando se utiliza solo.

Un estudio *in vivo* reciente de S. Pascolo demuestra que son necesarias unas dosis muy elevadas de Cloroquina para conseguir la muerte de las células tumorales. Por lo tanto, el uso de una dosis clínicamente aceptable para humanos por sí sola no parece eficaz para el tratamiento del cáncer, sin embargo, su administración en combinación con el tratamiento estándar de quimio o radioterapia podría tener efectos sinérgicos (Pascolo, 2016).

4.2. Efecto de Panobinostat sobre la proliferación de la línea celular VCAP

Para estudiar si Panobinostat afecta a la viabilidad celular de VCAP sometimos a las células a distintas concentraciones. Tras incubar durante 72h, se observó la inhibición del crecimiento a partir de la concentración 5 nM (Figura 2C).

Observamos que con una concentración de 5nM se detiene el crecimiento, y a partir de esta, concentraciones superiores disminuyen la proliferación.

El efecto máximo se alcanza a la concentración de 25nM. Sin embargo, debido a experimentos previos en el laboratorio con otras líneas celulares, se seleccionó la concentración de 50 nM para el estudio de citometría de flujo.

En el estudio de la citometría de flujo de VCAP frente al tratamiento con Panobinostat (Figura 2D) observamos diferencias significativas respecto al control, induciendo Panobinostat una mortalidad de casi un 80% a las 48h.

Los inhibidores de HDAC se han introducido con éxito en numerosos ensayos clínicos (EC) (Santini *et al.*, 2007). Panobinostat ha demostrado tener elevada potencia terapéutica tanto en monoterapia como en terapia combinada en modelos preclínicos y clínicos en pacientes con cáncer (Li *et al.*, 2014).

Nuestro estudio muestra que el uso de Panobinostat en la línea celular VCAP puede ser una terapia prometedora, aunque se precisan más EC que corroboren nuestros resultados.

4.3. Sinergia de Cloroquina y Panobinostat sobre la línea celular VCAP

Una vez estudiado el efecto de cada fármaco por separado, procedimos al estudio del efecto sinérgico de Cloroquina-Panobinostat para determinar si es más efectiva su asociación (Figura 3):

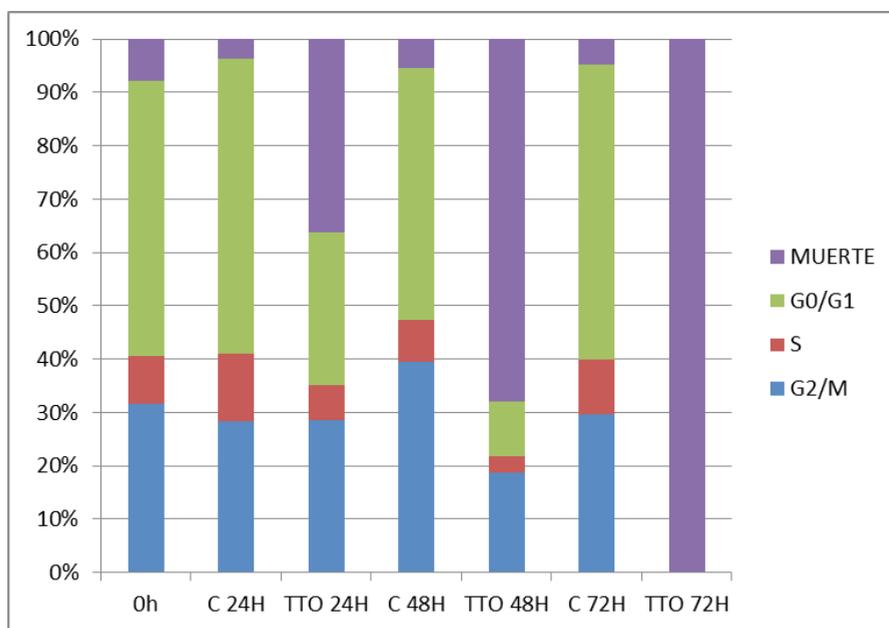


FIGURA 3. Efecto de la asociación de Cloroquina 25µM - Panobinostat 50nM sobre la distribución del ciclo de división celular de la línea celular VCAP.

Nuestros resultados muestran que la asociación tiene una potenciación muy efectiva, mostrando a las 72h la muerte celular del 100%, en comparación con un 35% a las 24h.

Un estudio preclínico estudió la actividad de la combinación de Panobinostat y Cloroquina *in vitro* e *in vivo* en células del Ca mama demostrando una eficacia superior al uso de cada uno de ellos por separado. Este efecto se debe a que la inhibición de HDAC induce estrés y apoptosis, promoviendo la autofagia como medio de supervivencia para las células tumorales, por lo que, la incorporación de un fármaco que inhiba la autofagia inducida por Panobinostat, como la Cloroquina, reduce la supervivencia y por tanto, la carga tumoral (Rao *et al.*, 2012). Es, por tanto, una asociación beneficiosa y efectiva frente al uso de dichos fármacos por separado. Sobre todo para la Cloroquina, el cual mostró unos efectos poco significativos sobre la línea celular VCAP.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados observados destacamos las siguientes conclusiones principales de este trabajo:

1. El uso de Cloroquina como inhibidor de la autofagia y Panobinostat como modificador epigenético tiene un efecto antitumoral en la línea celular de cáncer de próstata VCAP. Es especialmente importante el efecto de Panobinostat, causando una elevada mortalidad en células cancerígenas tras 72 horas de tratamiento.
2. El efecto sinérgico de Cloroquina y Panobinostat sobre VCAP ha demostrado ser un esquema muy potente causando la muerte a la mayoría de las células tumorales.
3. Estos resultados abren la posibilidad de emplear estos fármacos como una nueva estrategia de tratamiento en pacientes diagnosticados de cáncer de próstata. Sin embargo, son necesarios ensayos clínicos que avalen los resultados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyo DS, Gaviglio EA, Peralta-Ramos JM, Bussi C, Rodríguez-Galán MC, Iribarren P. Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer. *Int Immunopharmacol.* 2014; 18(1):55-65.
- Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics.* 2011; 3(4):503-18.
- He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43:67-93.
- Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes & Development.* 2011; 25(19):1999-2010.

- Kouznetsov VV, Amado Torres DF. Antimaláricos: construcción de híbridos moleculares de la cloroquina. *Univ Sci.* 2008; 13(3):306-20.
- Li X, Zhang J, Xie Y, Jiang Y, Yingjie Z, Xu W. Progress of HDAC inhibitor panobinostat in the treatment of cancer. *Curr Drug Targets.* 2014; 15(6):622-34.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451(7182):1069-75.
- Pascolo S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. *Eur J Pharmacol.* 2016; 771:139-44.
- Rao R, Balusu R, Fiskus W, Mudunuru U, Venkannagari S, Chauhan L, *et al.* Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11(4):973-83.
- Santini V, Gozzini A, Ferrari G. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. *Curr Drug Metab.* 2007; 8(4):383-93.
- Sharma S, Witteveen PO, Lolkema MP, Hess D, Gelderblom H, Hussain SA, *et al.* A phase I, open-label, multicenter study to evaluate the pharmacokinetics and safety of oral panobinostat in patients with advanced solid tumors and varying degrees of renal function. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015; 75(1):87-95.
- Stephenson L. Autophagy in cancer promotes Therapeutic Resistance. *Biofiles.* 2013; 8(9).
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 2008; 659(1-2):40-8.
- Yen C-Y, Huang H-W, Shu C-W, Hou M-F, Yuan S-SF, Wang H-R, *et al.* DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. *Cancer Lett.* 2016; 373(2):185-92.
- Zhang Y, Liao Z, Zhang L, Xiao H. The utility of chloroquine in cancer therapy. *Curr Med Res.* 2015; 31(5):1009-13.

