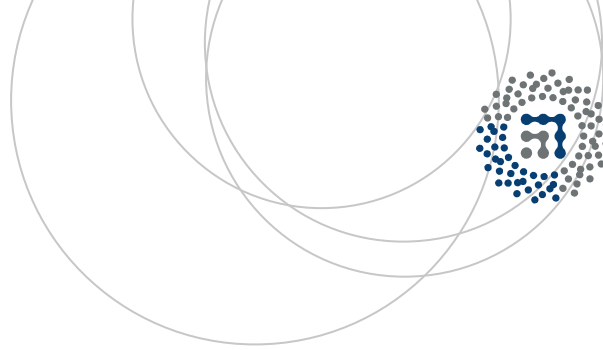


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana  
Biokimikako eta Biologia Molekularreko Gradua

# Histona desazetilasa inhibitzaileek giza melanoman duten efektuaren azterketa

Egilea:  
Leire Arreal López

Zuzendaria:  
Juan Miguel Aréchaga Martínez

# **AURKIBIDEA**

<b>1. Sarrera eta helburua</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Material eta metodoak</b> .....	<b>6</b>
2.1 Kultibo zelularrak.....	6
2.1.1 Erabilitako lerro zelularrak .....	6
2.1.2 Kultibo zelularren protokolo orokorra .....	6
2.2 Histona desazetilasen inhibizioa.....	7
2.3 Zelulen bideragarritasunaren analisia.....	7
2.4 Fluxu zitometria .....	8
2.4.1 Apoptosiaren azterketa anexina V-FITC eta propidio ioduro bidez.....	8
2.5 Anlisi estatistikoa .....	8
2.6 Irudien analisia .....	8
<b>3. Emaitzak</b> .....	<b>9</b>
3.1 Histona desazetilasa inhibitzaileek A375 eta HT-144 lerro zelularren bideragarritasuna murrizten dute.....	9
3.2 Histona desazetilasa inhibitzaileek A375 lerro zelularrean apoptosia eragiten dute ...	10
3.3 Histona desazetilasa inhibitzaileek aldaketa morfologikoak eragiten dituzte A375 lerro zelularrean .....	11
<b>4. Eztabaida</b> .....	<b>12</b>
<b>5. Ondorioak eta etorkizuneko ikuspegia</b> .....	<b>14</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>15</b>

## **1. SARRERA ETA HELBURUA**

Minbizi mota guztien artean azaleko minbizia da ohikoena. Azaleko minbizi desberdinen artean, berriz, melanoma da urrienetarikoa (kasuen % 2 baino gutxiago), baina, aldi berean, heriotza gehien eragiten duena. Gainontzeko azaleko minbiziak baino agresiboagoa den arren, fase goiztiarretan sendatzea posible da; hori dela eta berebiziko garrantzia dauka detekzio goiztiarrak eta ondorengo tratamenduak. Gainera, azken 30 urteetan melanomaren agerpen ratioek jasan duten gorakadak, batez ere gazteengan, are gehiago eskatzen du terapia eraginkor baten aurkikuntza.

Melanoma melanozitoetan garatzen den minbizi mota da; arrisku faktore garrantzitsuenen artean, faktore genetikoak eta argi ultramoreak DNAn eragiten dituen kalteak agertzen dira. Azaleko edozein lekutan garatu daiteke, baina melanomak zonalde konkretu batzuetan agertzeko joera izaten du: gizonetako kasuan enborra izaten da lekuri ohikoena, emakumeetan hanketan agertzen delarik batez ere. Lepoa eta aurpegia ere aipatzeko lekuak dira. Azala ez diren beste leku batzuetan (ahoa, begiak...) garatu daitezke ere, nahiz eta azaleko melanoma baino maiztasun gutxiagorekin agertzen diren<sup>1</sup>.

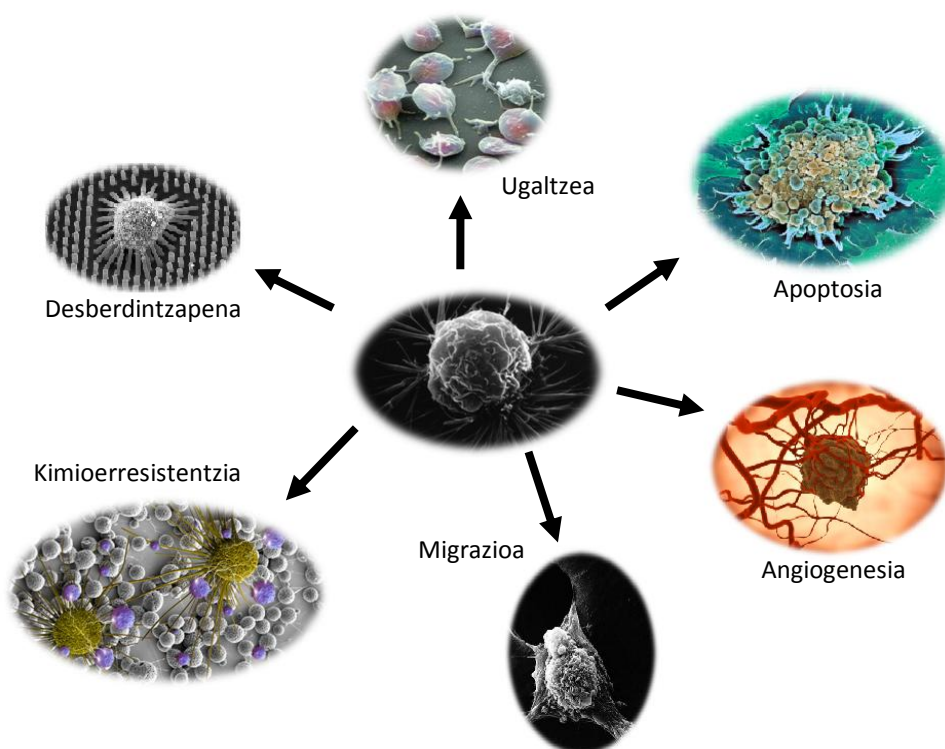
Tradizionalki, minbizia arazo genetikoaren ondorioz sortutako gaixotasun bat dela kontsideratu da; hots, geneetan gertatutako mutazioen eta aberrazio kromosomikoen ondorioz ematen den onkogeneen eta tumore ezabatzaileen funtzioen desorekaren ondorioz garatutako gaixotasuna. Hala ere, azken urteotan minbizia aldaketa epigenetikoek zuzendutako gaixotasuna ere badela frogatu da eta horrek minbiziaren aurkako terapia berrien diseinuaren esparruan aukera anitz zabaldu ditu<sup>2</sup>.

Aldaketa epigenetikoa kromatinan gertatzen den aldaketa orori esaten zaio, DNAREN nukleotido sekuentzian inolako eraginik ez duena. Aldaketa hauek batez ere histonetan, hots, DNAREN konpaktazioan parte hartzen duten proteinetan gertatzen dira eta mota askotakoak izan daitezke: azetilazioak, fosforilazioak, metilazioak, etab. Histonek pairatzen dituzten aldaketa hauek DNAREN eskuragarritasuna baldintzatzen dute, kasu batzuetan geneen adierazpena erregulatzen duten proteinak DNARI lotzea ahalbidetuz eta besteetan saihestuz, eta horrenbestez gene zehatz bat transkribatuko den edo ez finkatuz<sup>3</sup>. Aldaketa epigenetikoek geneen erregulazioan duten garrantzia kontuan izanda, ez da harrizkoa aldaketa hauek eragiten dituzten entzimak eta bidezidorrak iturrituzten terapiak garatzeko lanak gero eta ugariagoak izatea.

Aldaketa epigenetiko guztien artean histonen azetilazio eta desazetilazioek garrantzi handia daukate geneen adierazpenean. Orokorrean, histona azetilazio maila altua (hiperazetilazioa) transkripzio aktibitate handiagoarekin lotuta agertzen da, azetilazio maila baxua (hipoazetilazioa) transkripzio aktibitate txikiagoarekin lotuta agertzen den bitartean. Histonen azetilazio eta desazetilazio prozesuak katalizatzeaz arduratzen diren entzimak histona azetiltransferasak (HAT) eta histona desazetilasak (HDAC) dira, hurrenez hurren. Bi entzima mota hauen jardura koordinatuak finkatzen duenez zein den histonen azetilazio maila eta ondorioz geneen transkripzio maila, azken urteetan garatutako terapia askoren itu-molekula bilakatu dira.

HDAC-ek histonen amino muturreko lisinetatik azetilo taldeak kentzen dituzte, eta horrek DNA eta nukleosomen arteko lotura estuagoa izatea baimentzen du kromatinaren konpaktazioa areagotuz eta, ondorioz, transkripzioaren errepresioa eraginez. Gaur egun 18 HDAC ezagutzen dira, eta 4 taldetan (I, IIa eta IIb, III eta IV) banatzen dira legamien HDAC-ekiko duten homologiaren arabera<sup>3</sup>.

Azetilazioaren eta desazetilazioaren arteko oreka fisiologikoa galtzeak kromatinaren egituraren aldaketak eragiten ditu eta horrek ziklo zelularrekin, desberdintzapenarekin, ugaltzarekin eta apoptosiarekin lotuta dauden geneen desregulazioa eragiten du (1. irudia).



**1. irudia:** HDAC-ek funtzio desberdinak kontrolatzen dituztenez, hauen inhibizioak efektu biologiko desberdinak izan ditzake ingurune zelularren arabera (irudi egokitua<sup>4</sup>).

Beraz, hau guztia kontuan hartuta, histonen eta beste proteina batzuen azetilazio maila kontrolatzen duten entzimen funtzionamendua garrantzitsua baldin bada zelulek ondo lan egiteko, hauen ez-ohiko aktibitateak eta azetilazio patroien galerak tumoreak garatzea eragin dezakete. Horren ondorioz, HDAC-k bereziki ito interesgarriak bilakatu dira minbiziaren aurka egiteko ideiarekin.

Histona desazetilasa inhibitzaileak (HDACi) minbiziaren aurkako konposatu eraginkorrak dira. HDACi sintetiko eta natural desberdinak deskribatu dira eta haien egitura kimikoaren arabera edota HDAC desberdinekiko duten afinitatearen arabera sailkatzen dira.

Egitura kimikoaren arabera sailkatzean, konposatuak 6 talde desberdinetan banatzen dira: kate motzeko gantz azidoak, hidroxamatoak, benzamidak, tetrapeptido ziklikoak, ketona elektrofilikoak eta molekula hibridoak. Hauetako batzuk HDAC-ekiko duten afinitatearen arabera sailkatzen direnean, 2 talde nagusi desberdintzen dira: alde batetik, pan-HDACi moduan ezagutuak eta espektro zabalekoak direnak, hau da, HDAC mota desberdinak inhibitzeko gaitasuna dutenak eta, beste alde batetik, HDAC I eta II motak inhibitzen dituztenak modu selektibo batean. Aipatu behar da ere, talde hauetatik at beste inhibitzaile batzuk ere badaudela eta HDAC mota zehatz batzuekiko espezifikoak direla<sup>2,5</sup>.

HDACi-ek minbizi zelulen apoptosia, hazkuntzaren eta ziklo zelularren gelditzea, desberdintzapena eta angiogenesiaren inhibizioa eragin dezakete. Ezinezkoa da pentsatzea akzio mekanismo bakar bat dela minbizi hazkuntzaren aurkako efektu guztiak eragiten duena inhibitzaile desberdinekin tratatzerakoan, eta hori dela eta, uste da efektu desberdinen konbinazioaren ondorioz ematen dela HDACi-en tumoreen aurkako funtzioa<sup>5</sup>.

Hau guztia horrela izanda, HDACi-ek melanoman duten efektua argitzeko asmoz, 5 inhibitzaile testatzen dira bi lerro zelularren (A375 eta HT-144) bideragarritasunean zein efektu duten ikusteko. Beste minbizi mota batzuetan ikusi den efektu pro-apoptotikoa melanoman baieztatzeko eta bideragarritasunean ikusitako emaitzak prozesu horrekin lotu daitezkeen modu zehatzago batean aztertzeko, apoptosia neurtu da. Epitelio-mesenkima trantsizioa (EMT) oso prozesu garrantzitsua da minbizien metastasien garapenean; hala ere, HDAC inhibitzaileekin prozesu honen garapena edo inhibizioa ematen den alderdi eztabaidagarria izaten jarraitzen du ikertzaileen artean. Hori horrela izanik, inhibitzaileek melanoma zeluletan aldaketa morfologikoak eragiten dituzten jakiteko asmoz, tratatutako kultiboak aztertu dira. Nahiz eta inhibitzaileek minbiziaren aurkako efektuak eragiten dituzten, bideragarritasunaren murrizpena eta efektu pro-apoptotikoak hain zuzen ere, bizirik jarraitzea lortzen duten zelulek morfologia inbaditzailea hartzen dute, metastasia garatzeko arriskuarekin.

## **2. MATERIAL ETA METODOAK**

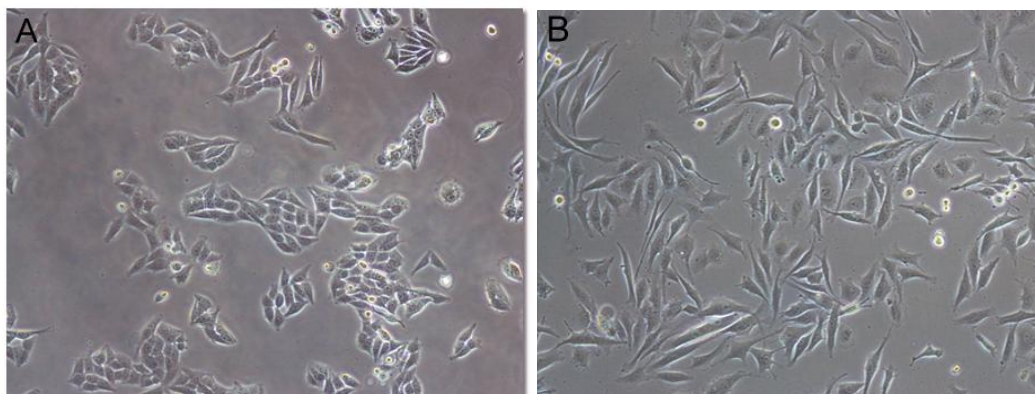
### **2.1 Kultibo zelularrak**

#### **2.1.1 Erabilitako lerro zelularrak**

Ikerketa honetan 2 melanoma lerro zelular erabili dira, Kultibo Tipoen Amerikar Bildumatik (ATCC) eskuratutakoak: A375 eta HT-144. Biek hazkuntza itsaskorra agertzen dute eta melanina gabekoak dira.

A375 lerro zelularra (2A irudia) D. J. Giard-ek eskuratu zuen 1973. urtean 54 urtetako emakume kaukasiar baten melanoma gaizto batetik. Lerro zelular honetako zelulek morfologia epiteliala agertzen dute.

HT-144 zelulek (2B irudia), aldiz, morfologia fibroblastikoa agertzen dute eta 29 urtetako gizon baten melanoma gaiztoaren metastasitik lortu ziren.



**2. irudia:** giza melanoma zelulen fase kontrasteko irudiak: (A) A375 eta (B) HT-144 (x10).

#### **2.1.2 Kultibo zelularren protokolo orokorra**

Lerro zelularrak DMEM medio osatuan kultibatu dira, zeinak SBF du % 10ean, penizilina-estreptomizina % 1ean eta L-glutamina % 1ean. Kultibo zelular guzti hauen maneia esterilitate baldintzetan egin da, biosegurtasun IIA motako fluxu laminarreko kanpaien barnean (Telstar BioUltra). Kultiboak normoxia egoeran (% 21 O<sub>2</sub>), hezetasun balio asetuak eta % 5 CO<sub>2</sub>-dun inkubagailuetan (Heraeus 6000) gordetzen dira.

Behin kultiboek gainazalaren % 70a estaltzean, hauek azpi-kultibatu egiten dira. Horretarako, kultibo medioa kendu eta PBS-rekin bi garbiketa burutu ondoren, zelulak flaskotik askatzen dira Tripsina-EDTA (Sigma, T4049) soluzio batekin 5 minutuz inkubatuz 37° C-tan. Azkenik, hazkuntza medio berria gehitzen da, zelulak flasko berrietan banatuz diluzio egokietan.

Lerro zelularren biltegitratzea nitrogeno likidodun edukiontzietan egiten da. Prozesu hau aurrera eramateko, zelulak Tripsina-EDTA disoluzioarekin askatzen dira, DMEM erabilita izozten direlarik. Honi, DMSO-a (Sigma-Aldrich) % 10ean gehitzen zaio, zeina kriobabesle moduan aritzen den, kristal intrazelularren eraketa galaraziz. Izozte prozesua modu progresibo batean garatzen da (gradu bat minutuko  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  arte), nitrogeno likidoan gorde direlarik  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan. Kontrako prozesua, desizoztea, zuzenean egiten da nitrogeno likidotik  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tara, modu horretan zelulen bideragarritasuna hobetuz.

## **2.2 Histona desazetilasen inhibizioa**

HDAC inhibitzaileekin tratamendua denbora desberdinetan egiten da esperimentuaren arabera; inhibizioa aurrera eramateko, media aldutzen da inhibitzaileak gehituta daramatzalarik, inkubagailuan gordez behar den denboraz. Erabilitako inhibitzaile kontzentrazioak hurrengokoak izan dira: 2 mM butiratoaren (Sigma-Aldrich) kasuan, 100 nM A trikostatinare (TSA) (Sigma-Aldrich) kasuan, 1 mM azido balproikoaren (VPA) (Sigma-Aldrich) kasuan, 3  $\mu\text{M}$  vorinostat-aren (Selleckchem) kasuan eta 10, 50 eta 100 nM panobinostat-aren (Selleckchem) kasuan.

## **2.3 Zelulen bideragarritasunaren analisia**

HDACi-ek zelulen bideragarritasunean duten eragina neurtzeko MTT teknika kolorimetrikoa erabili da, zeina 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromuroaren (MTT) erreduzitzean oinarritzen da. Prozesu hau sukzinato erreduktasa entzima mitokondrialak katalizatzen du bizirik dauden eta MTT-a barneratu duten zeluletan, konposatu hau formazan kristaletan bihurtzen duelarik. Azken hau produktu koloreduna eta mintzarekiko iragazkorra da, beraz, disolbatzaile baten laguntza behar izango da formazan-a disolbatzeko eta mintza apurtzeko, modu horretan absorbatzia neurtuko delarik. Hau kontuan izanda, teknika hau askotan erabiltzen da zelulen biziraupena edo ugaltzea neurtzeko, mitokondrien aktibitate totala lotuta baitago bizirik dauden zelula kopuruarekin. MTT (Sigma-Aldrich) 10  $\mu\text{l}$  gehitzen dira putzu bakoitzeko eta hauspeakina disolbatzeko 100  $\mu\text{l}$  DMSO erabiltzen dira; absorbantziaren neurketa 560 nm-tan egiten da (Biotek, Synergy HT).

A375 eta HT-144 zelulak 96 putzutako plaka batean erein dira ( $2 \times 10^4$  zelula/ 100  $\mu\text{l}$  medio putzu), kontrol eta tratamendu bakoitzeko 6 erreplika jartzen direlarik. Panobinostat-en dosi desberdinen entsegua aurrera eramateko baldintza berdinak erabiltzen dira. Behin inhibitzaileak gehituta, zelulak inkubagailuan gorde eta 24, 48 eta 72 ordutara egiten dira MTT saioak.

## **2.4 Fluxu zitometria**

### **2.4.1 Apoptosiaren azterketa anexina V-FITC eta propidio ioduro bidez**

Mintz basaleko fosfolopidoak modu asimetriko batean banatzen dira mintzaren kanpoko eta barruko aldeetan. Zelula bizietan, fosfatidilserina mintzaren barneko aldean aurkitzen da, baina zelula apoptotikoetan flip-flop mekanismoaren bidez kanpo aldera begira gelditzen da.

Anexina V-ak fosfatidilserinagatik afinitate altua dauka; horregatik, anexina V-ari fluorokromo bat gehitzen zaio, fluoreszeina isotiozianatoa (FITC), fluxu zitometrian zelula apoptotikoen markatzaile bezala erabiltzeko. Fosfatidilserinaren translokazioa mintzaren osotasunaren galera baino lehen ematen da, honen ondoren ahalbidetzen delarik molekula kationikoak zelulan sartzea, propidio ioduroa (IP) kasu. Hau DNA tindatzaile bat da, eta zelulan sartzeko bere gaitasuna mintzaren iragazkortasunaren araberakoa da. Hori horrela izanda, oso garrantzitsua da zelulak ez permeabilizatzea markaketa egiteko momentuan.

Beraz, anexina V-FITC eta IP (Immnuostep) nahasketa tindatzaile moduan erabilia eta fluxu zitometriaren laguntzaz, zelula ez apoptotikoak (anexina negatiboak/ IP negatiboak), apoptosi goiztiarrean dauden zelulak (anexina positiboak/ IP negatiboak) eta apoptosi berantiarrean dauden edo nekrotikoak diren zelulak (anexina positiboak/ IP positiboak) desberdindu ahal izango dira.

A375 zelulak tratamenduekin 48 orduz kultibatzen dira, ondoren tripsinarekin desitsasten direlarik; aurretik PBS-arekin 2 garbiketa egiten dira, hasierako medioa jasotzen delarik ere. Tripsinizatu ondoren, zentrifugatu eta DMEM medioarekin berresekitzen dira, beharrezko bolumena ( $1 \times 10^5$  zelula izateko) hartuz. Berriz ere PBS-arekin garbitu ondoren, IP eta anexina gehitzen dira. Laginak 15 minutuz ilunpetan inkubatu ondoren zitometroan (Galios, Beckman Coulter) aztertzen dira, IP 620 nm-tan eta anexina 520 nm-tan neurtuz.

## **2.5 Analisi estatistikoa**

Datuen analisi estatistikoa GraphPad Prism 6 programaren bidez egin da. Datuak estatistikoki aztertu dira bi faktoretako ANOVA (two-way ANOVA) banaketa erabilia; honen bidez, zehaztu ahal izan da tratatutako laginak kontrolarekin alderatzean agertzen zituzten desberdintasunak adierazgarriak diren edo ez.  $p < 0.05$  estatistikoki esangarritzat hartu da.

## **2.6 Irudien analisia**

Fase kontrasteko mikroskopioko (Nikon Eclipse Ti-S) irudiak Photoshop 7-rekin tratatu dira.



### 3. EMAITZAK

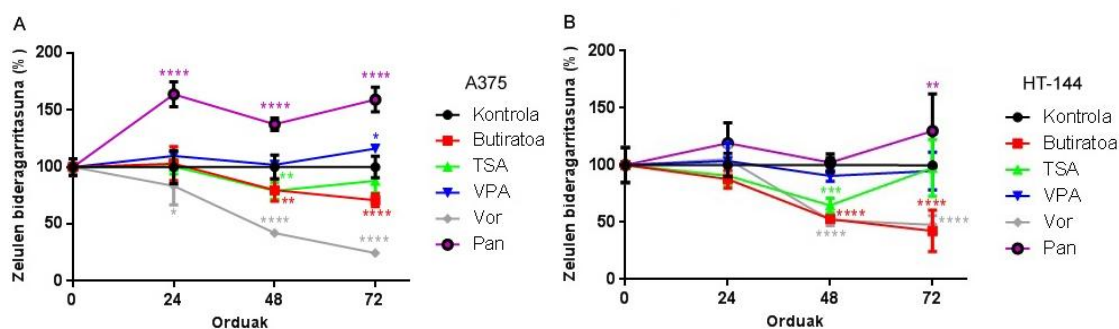
#### 3.1 Histona desazetilasa inhibitzaileek A375 eta HT-144 lerro zelularren bideragarritasuna murrizten dute

HDAC-en inhibizioak melanoma zelulen bideragarritasunean duen efektua argitzeko, A375 eta HT-144 giza melanoma lerro zelularrak 5 HDACi desberdinekin tratatu dira eta aipatutako denbora puntuetan hauen bideragarritasuna neurtu da MTT-aren bidez.

3. irudian ikus daitekeen bezala, butiratoa eta vorinostat-a dira bi lerro zelularren bideragarritasuna gehien mugatzen duten inhibitzaileak; efektu hau denborarekiko dependentea da, inkubazio orduak areagotu ahala zelulen biziraupen maila txikiagotu egiten baita. A375 lerro zelularren kasuan, vorinostat-aren eragina nabarmenagoa da eta 72 ordura zelulen bideragarritasuna % 20koa da; HT-144 lerro zelularren kasuan berriz, bai butiratoak, bai vorinostat-ak % 50ko bideragarritasuna eragiten dute 72 ordura.

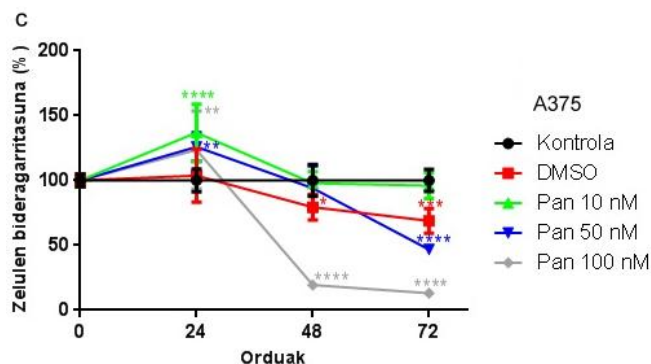
A trikostatinak duen efektuari erreparatzean, biziraupenaren murrizpen esanguratsuen 48 ordutara ikusten da bi lerro zelularretan. Hala ere, HT-144 lerro zelularrean du eragin nabarmenagoa, bideragarritasuna % 70era murriztuz, A375 zelulen kasuan bideragarritasun balioak % 80ra iristen direlarik. Azido balproikoaren kasuan, bideragarritasuna ere 48 ordutara murrizten da HT-144 lerro zelularrean, % 90eko bideragarritasun balioak lortzen direlarik; A375 lerro zelularren kasuan, aldaketa esanguratsurik ez da ikusten.

Panobinostat-aren efektua aztertzean, bideragarritasunaren murrizpenik ez da ikusten; kontrari, bideragarritasuna bi lerro zelularretan nabarmenki igotzen da inhibitzailearekin tratatu ondoren, itxuraz zelulen ugaltzea ematen delarik.



**3. irudia:** HDACi-ekin tratatutako (A) A375 eta (B) HT-144 lerro zelularren bideragarritasunaren kuantifikazioa. Inhibitzaileen efektua kontrolarekiko dago normalizatua, hau % 100 bezala hartzen delarik. Errore barrekin 6 erreplikaren arteko desbiderapen estandarra adierazten dute. Esangarritasun estatistikoa: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (TSA: A trikostatina; VPA: azido balproikoa; Vor: vorinostat; Pan: panobinostat).

Panobinostat-ek eragindako ugaltzeari azalpen bat emateko ideiarekin, kontzentrazio altuagoak frogatzen dira A375 lerro zelularrekin. 4. irudian argi ikusi daiteke 72 igaro ondoren bi kontzentrazio altuenetan bideragarritasuna txikitu egiten dela modu nabarmen batean; batez ere esangarria da 100 nM erabili diren kasua, bideragarritasuna asko murriztea lortuz, % 15eko balioak agertzen dituelarik.



**4. irudia:** Panobinostat kontzentrazio gorakorren eragina A375 zelulen bideragarritasunean. DMSO-dun egoera gehitzen da, inhibitzailea bertan diluituta egonik, bideragarritasunaren jaitsiera DMSO-ari ez dagokiola ziurtatzeko. Inhibitzailearen efektua kontrolarekiko dago normalizatu, hau % 100 bezala hartzen delarik. Errore barrek 6 erreplika biologikoen arteko desbiderapen estandarra adierazten dute. Esangarritasun estatistikoa, kontrolarekiko konparatuz: \*p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

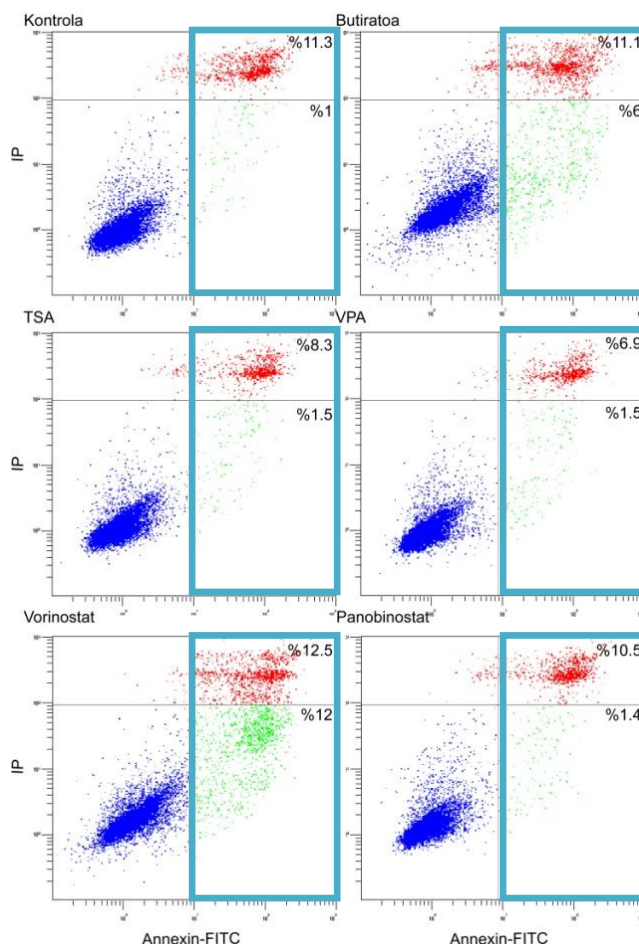
Laburbilduz, frogatutako 5 HDACi-ek melanoma zelulen bideragarritasuna murrizten dute, baina, hala ere, butiratoa eta vorinostat-a dira eraginkorrenak. Panobinostat-arekin egindako saiakuntzak argi uzten du kontzentrazio egokia aurkitzearen garrantzia, entsegu hori beste inhibitzaileetara ere zabaldu daitekeelarik.

### **3.2 Histona desazetilasa inhibitzaileek A375 lerro zelularrean apoptosia eragiten dute**

Aurretik ikusitako biziraupen tasa baxuek zelula heriotza programatuarekin zerikusirik duten aztertzeke, eta aldi berean HDACi-ek beste minbizi motetan eragiten duten efektu pro-apoptotikoak<sup>6,7</sup> melanoman ere behatzen diren frogatzeko, HDACi-ekin 48 orduz tratatutako A375 zelulak anexina V eta IP-kin tindatzen dira ondoren fluxu zitometria bidez aztertzeke.

Zelulen bideragarritasun emaitzekin bat, butiratoak eta vorinostat-ek eragiten dute apoptosi mailarik altuenak A375 zeluletan (5. irudia); kontrolean % 12.3ko apoptosi balioak neurtu diren bitartean, butirato eta vorinostat tratamenduek % 17.1 eta % 24.5ko apoptosi tasak eragin dituzte hurrenez hurren, azken balio hau guztien artean altuena izanik. Beste 3 HDAC inhibitzaileen kasuan, apoptosi balioak kontrolaren antzekoak izan dira, hortaz, inhibitzaile hauek apoptosian ez dute eraginik izan.

Argi dago 48 ordutara butiratoa eta, batez ere, vorinostat-a direla zelulen apoptosia esanguratsuki areagotzen duten inhibitzaileak, bestelako hirurek denbora horretan inongo efekturik eragiten ez duten bitartean.



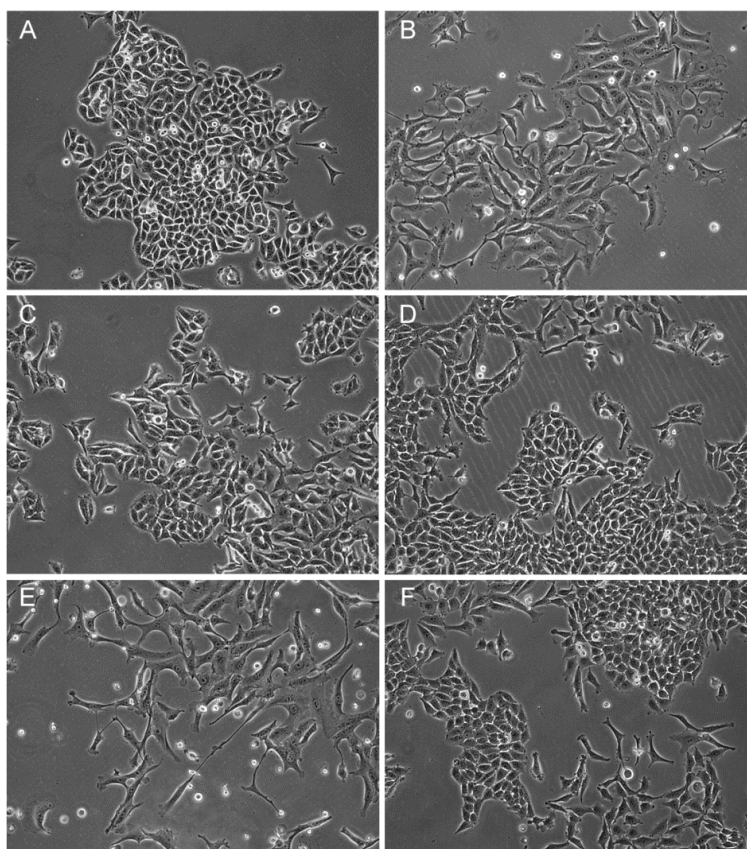
**5. irudia:** HDACi-en efektua A375 zelulen apoptosian; 2 kasutan, butirato eta vorinostat erabiltzean, kontrolean baino balio altuagoak ikusten diren arren, beste 3 inhibitzaileen kasuan balio horiek ez dira lortzen. Lauki urdinean barneratutako zelulak dira apoptosian daudenak (anexina positiboak/ IP positibo edota negatiboak).

### **3.3 Histona desazetilasa inhibitzaileek aldaketa morfologikoak eragiten dituzte A375 lerro zelularrean**

48 ordutara tratatu ondoren, HDACi guztiek aldaketa morfologikoak eragiten dituzte A375 melanoma zeluletan, zeintzuek itxura luzangagoa agertzen duten tratatu gabekoekin konparatzean (6. irudia).

Kasu honetan ere, eragin handiena izan zuten bi inhibitzaileak butiratoa eta vorinostat-a izan dira, ez bakarrik zelulen morfologian aldaketa nabarmenenak eragiteagatik, baizik eta aldaketa horiek jasan duten zelulen kopurua ere handiagoa izan delako bestelako tratamenduekin

konparatzen baldin bada (6B eta 6E irudiak). Izan ere, panobinostat-ak zelulen morfologia eraldatzea eragiten duen arren, aldaketa hori ez da aurretik aipatutako bi inhibitzaileekin bezain nabarmena (6F irudia). TSA eta VPA tratamenduak, aldiz, eragin gutxiena izan duten HDACi-ak izan dira, zelulen morfologia kontrolekoen antzekoa delarik (6C eta 6D irudiak).



**6. irudia:** A375 zelulen morfologiaren azterketa HDACi-ekin tratatu ondoren; butiratoak eta vorinostat-ak aldaketa nabarmenak eragiten dituzte, panobinostat-ak neurri txikiagoan eragiten ditu eta TSA eta VPA-rekin ez dira aldaketa esangarriak antzematen kontrolarekin konparatzean. (A) Kontrola, (B) butiratoa, (C) A trikostatina, (D) azido balproikoa, (E) vorinostat eta (F) panobinostat (x10).

Inhibitzaileen ondorioz eraldatutako zelulek morfologia mesenkimala edo fibroblastikoa aurkezten dute, fenotipo inbaditzaile batekin lotu daitekeena; izan ere, epitelio-mesenkima trantsizio (EMT) prozesua minbizien metastasiarekin erlazionatzen da, hauen aurrera egitea lagundu edo ahalbidetu dezakeelarik.

#### **4. EZTABAIDA**

Ikerketa desberdinek erakutsi dute HDACi-ak minbiziaren aurkako terapia gisa erabili litezkeela minbizi zelulen apoptosia, ziklo zelularren gelditzea eta desberdintzapena eragiten dutelako; hala ere, efektu horien atzetik dauden mekanismo molekularrak ez daude guztiz argi gaur egun.

Giza melanoma zeluletan inhibitzaile hauek duten eragina argitzeko asmoz, 5 HDACi desberdin aukeratu ditugu eta hauek A375 eta HT-144 lerro zelularretan bideragarritasuna modu esangarrian murrizten duten edo ez aztertu da; izan ere, beste minbizi batzuetan efektu hori aztertua izan da, inhibitzaileek bideragarritasunaren murrizpena eragiten dutela ikusten delarik<sup>6,7</sup>. Melanoman, butiratoak eta vorinostat-ak zelulen bideragarritasuna nabarmen murrizten dute, beste 3 inhibitzaileek ia aldaketarik ez zituztelarik eragiten kontrolarekin konparatzean. Jakina da panobinostat-a HDACi eraginkorrenen artean aurkitzen dela, eta horren ondorioz, MTT entsegua kontzentrazio desberdinetan aurrera eramatea erabaki zen, bideragarritasunaren murrizpena emango zuen kontzentrazioaren bila; nM kontzentrazioak mantenduta, baino balio handiagoekin, bideragarritasunean gutxipen esangarria lortzen da. Hori horrela izanda, argi gelditzen da kontzentrazio egokiena bilatzearen garrantzia; hala ere, ezin da kontzentrazioa nahi beste igo nahi den efektua lortzeko, azken batean, gizakiengan toxikotasuna murrizteko, efektua lortzeko ahalik eta kontzentrazio txikiena erabiltzen saiatzen garelako. MTT entseguari dagokionez, esan behar da lortutako emaitzek entsegu bakar moduan ezin dela erabili aditzera ematen digutela, izan ere, aldakortasun handia agertzen dute. Saiakuntza osagarriak beharrezkoak dira ikusitakoa ziurtatzeko.

Aurretik esan den bezala, HDACi-en efektu antitumoralak, besteak beste, minbizi zeluletan apoptosia eragiteko duten ahalmenean datza, eta hori dela eta, hautatutako 5 HDACi-ek melanoma zelulen apoptosian duten eragina ere aztertu zen. Bideragarritasun saioan lortutako emaitzekin auresan zitekeen bezala, butiratoarekin eta vorinostat-arekin tratatutako zelulek, kontrol zelulek baino apoptosi maila altuagoak aurkeztu zituzten. Nahiz eta emaitza hauek apoptosia eta bideragarritasuna erlazionatu ditzaketen, ziklo zelularren geldipena eta desberdintzapena aztertzea ondo etorriko lirake azalpen osatuagoa emateko. TSA, VPA eta panobinostat-en kasuan, berriz, ez zelulen bideragarritasunean ez apoptosian, ez zen eragin nabarmenik antzeman, kasu guztietan lortutako emaitzak kontrolean lortutakoen parekoak izan baitziren.

Metastasia pausu desberdinak dituen prozesua da, zeinetan zelulak minbizi primariotik askatzen diren eta beste organo batzuk kolonizatzen dituzten; honek aurrera egiteko, beharrezkoa da zelula epitelialak bere polaritatea eta bestelako zelulekin duen atxikimendua galtzea migratzeko eta bestelako ehunak inbaditzeko gaitasuna duen zelula mesenkimala bilakatzeko (epitelio-mesenkima trantsizioa, EMT). Hau horrela izanik, EMT prozesuak garrantzi handia dauka metastasien garapenean; baina arlo eztabaidagarria da, izan ere, talde batzuek HDAC inhibitzaileek EMT prozesua ematea eragiten dutela esaten duten bitartean<sup>8,9</sup>, beste batzuek EMT-ren inhibizioa azaltzen dute<sup>10</sup>. Gure kasuan, butiratoarekin eta vorinostat-arekin

ematen diren aldaketa morfologikoek bi inhibitzaile hauek EMT prozesua induzitzen dutela aditzera ematen digute; zelulek forma mesenkimala edo fibroblastikoa hartzen dute, metastasi prozesua ahalbidetu edo erraztuko dutelarik<sup>11</sup>.

Emaitza hauek guztiak bateratuz, ikusi dezakegu efektu gehien eragiten duten bi inhibitzaileak butiratoa eta vorinostat-a direla, bai onerako eta txarrerako; zelulen bideragarritasuna jaitsi eta apoptosia eragiten badute ere, bizirik jarraitzen duten zelulek fenotipo inbaditzailea agertzen dute, horrek inhibitzaile horien erabilpena mugatu dezakeelarik etorkizuneko tratamendu bati begira. Gainontzeko 3 inhibitzaileekin entsegu gehiago egitea komeni da, izan ere, behatutako efektu eza kontzentrazio egokia ez hautatuagatik izan baitaiteke.

## **5. ONDORIOAK ETA ETORKIZUNeko IKUSPEGIA**

HDACi-ek bestelako minbizietan duten efektu onuragarria melanoman errepikatu ez badugu ere, epigenetika ezagutzea garrantzitsua da terapiak garatzen jarraitzeko. Horren erakusgarri dira minbizi desberdinak tratatzeko ikuspegiarekin fase klinikoetan aurkitzen diren histona desazetilasa inhibitzaile desberdinak: vorinostat-a, esaterako, onartua izan da T zelulen limfomaren tratamendurako. HDAC desberdinak ezagunak dira eta hauen artean desberdintzeko gaitasuna duten farmakoak garatzea, espezifikotasuna lortzeko modua izan daiteke; horretarako, argi dago, HDAC-en inguruan dugun jakintasuna sakontzen jarraitu beharko dela.

Gure kasuan, nahiz eta efektu pro-apoptotikoak ikusi diren inhibitzaile batzuekin, morfologia inbaditzailea duten zelulak ere agertu dira; honek, terapia hau gizakietan aplikatzeko ideia atzera bultzatzen du, onurak baino, ondorio larri gehiago ekarriko lituzkeelako. Baina lehenengo entseguetako emaitzak zentzu baikor batean ikusi daitezke ere; izan ere, gaur egun, gaixotasun gehienetan terapia konbinatuak garatzen dira. Argi geldituz analisi biokimiko gehiago beharrezkoak direla melanoman prozesu hauek jarraitzen dituzten bideak ulertu ahal izateko, modu bat izan daiteke albo-ondorioak indargabetzeko edo nahi ez diren prozesuak inhibitzeko, eta beraz, terapia egokiak garatzeko. Hau da, garrantzitsua izango da identifikatzea zein puntu izan daitezkeen ahulenak minbizi zelula horien aurka modu eraginkorrean egiteko.

Terapia egokiak garatzea ezinbestekoa da minbizien aurkako borrokan, eta horretarako ere, hauen inguruan ahalik eta gehien jakitea oso garrantzitsua da; oso zaila izango da minbiziekin guztiz bukatzea, gizakiarekiko intrintsekoak baitira, eta beraz, gure esku dagoen bakarria estrategia berrien garapenarekin laguntzea izango da, betiere, gure osasuna zaintzeaz arduratzen baldin bagara.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

1. American Cancer Society: What is melanoma skin cancer? Eskuragarri: <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/index> orrialdean. 2014ko ekainak 10ean kontsultatuta.
2. Bolden, Jessica E., Melissa J. Peart, and Ricky W. Johnstone. "Anticancer Activities of Histone Deacetylase Inhibitors." *Nature Reviews Drug Discovery* 5.9 (2006): 769-84.
3. Bojang, Pasano, and Kenneth S. Ramos. "The Promise and Failures of Epigenetic Therapies for Cancer Treatment." *Cancer Treatment Reviews* 40.1 (2014): 153-69.
4. Witt, Olaf, Hedwig E. Deubzer, Till Milde, and Ina Oehme. "HDAC Family: What Are the Cancer Relevant Targets?." *Cancer Letters* 277.1 (2009): 8-21.
5. West, Alison C., and Ricky W. Johnstone. "New and Emerging HDAC Inhibitors for Cancer Treatment." *Journal of Clinical Investigation* 124.1 (2014): 30-39.
6. Kumagai, Takashi, Naoki Wakimoto, Dong Yin, Sigal Gery, Norihiko Kawamata, Noriyuki Takai, Naoki Komatsu, Alexy Chumakov, Yasufumi Imai, and H.phillip Koeffler. "Histone Deacetylase Inhibitor, Suberoylanilide Hydroxamic Acid (Vorinostat, SAHA) Profoundly Inhibits the Growth of Human Pancreatic Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 121.3 (2007): 656-65.
7. Chen, Shuo, Yang Zhao, Wen-Feng Gou, Shuang Zhao, Yasuo Takano, and Hua-Chuan Zheng. "The Anti-Tumor Effects and Molecular Mechanisms of Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) on the Aggressive Phenotypes of Ovarian Carcinoma Cells." Ed. Ken Mills. *PLoS ONE* 8.11 (2013): E79781.
8. Giudice, Fernanda S., Decio S. Pinto, Jacques E. Nör, Cristiane H. Squarize, and Rogerio M. Castilho. "Inhibition of Histone Deacetylase Impacts Cancer Stem Cells and Induces Epithelial-Mesenchyme Transition of Head and Neck Cancer." Ed. Irene Söderhäll. *PLoS ONE* 8.3 (2013): E58672.
9. Jiang, Guan-Min, Hong-Sheng Wang, Fan Zhang, Kun-Shui Zhang, Zong-Cai Liu, Rui Fang, Hao Wang, Shao-Hui Cai, and Jun Du. "Histone Deacetylase Inhibitor Induction of Epithelial–mesenchymal Transitions via Up-regulation of Snail Facilitates Cancer Progression." *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833.3 (2013): 663-71.
10. Rhodes, Lyndsay V., Chandra R. Tate, Chris Segar, Hope E. Burks, Theresa B. Phamduy, Van Hoang, Steven Elliott, Diari Gilliam, Nell Pounder, Muralidharan Anbalagan, Douglas B. Chrisey, Brian G. Rowan, Matthew E. Burow, and Bridgette M. Collins-Burow. "Suppression of triple-negative breast cancer metastasis by pan-DAC inhibitor panobinostat via inhibition of ZEB family of EMT master regulators." *Breast Cancer Research and Treatment* 145 (2014): 593-04.
11. Díaz Nuñez, María, Alejandro Díez-Torre, Olivier de Wever, Ricardo Andrade, Jon Arluzea, Margarita Silió, and Juan Aréchaga. "Histone deacetylase inhibitors induce invasion of human melanoma cells via differential regulation of N-cadherin expression and RhoA activity." (2014, publikatu gabe)