



Departamento de Inmunología  
Laboratorio de Investigaciones Médicas  
Hospital Universitario "San Cecilio"  
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra"  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Granada

---

**TESIS DOCTORAL**

**PARP-1, NUEVA DIANA EN EL  
TRATAMIENTO DEL CARCINOMA  
HEPATOCELULAR.**

---

**ROSA QUILES PÉREZ**

GRANADA, MARZO 2008.





# **PARP-1, NUEVA DIANA EN EL TRATAMIENTO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR.**

---

Tesis Doctoral presentada por **ROSA QUILES PÉREZ**,  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Granada

## Directores de tesis:

Dra. ÁNGELA RUIZ EXTREMERA, Profesora Titular de la Universidad de  
Granada.

Dr. JOSÉ ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ, Contratado Ayudante del FIS, del  
Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Dr. FRANCISCO JAVIER OLIVER POZO, Investigador Científico del  
Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neira, CSIC, Granada.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la doctorando Rosa Quiles Pérez en el Laboratorio de Investigaciones Médicas del Hospital Universitario San Cecilio, y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y concluida el 10 de Marzo de 2008.

Fdo. Rosa Quiles Pérez



## AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

---

ÁNGELA RUÍZ EXTREMERA, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, JOSÉ ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ, CONTRATADO AYUDANTE INVESTIGACIÓN DEL FIS, HOSPITAL UNIVERSITARIO “SAN CECILIO” DE GRANADA Y FRANCISCO JAVIER OLIVER POZO, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CSIC.

CERTIFICAN: Que la presente Tesis, titulada “PARP-1, NUEVA DIANA EN EL TRATAMIENTO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR”, de la que es autor la Lda. Dña. ROSA QUILES PÉREZ, bajo el Programa de Doctorado “INMUNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR” del departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Investigaciones Médicas del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que:

AUTORIZAN la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada a 30 de enero de dos mil ocho.



Ángela Ruiz Extremera



José Antonio Muñoz Gámez



Francisco Javier Oliver Pozo





A mi niña  
A mis padres  
A mi Paula  
A mis hermanos y  
a mi Abuela



## AGRADECIMIENTOS

---

A mis directores de Tesis, la Dra. Ángela Ruiz Extremera, por su confianza, todo su cariño y apoyo incondicional, al Dr. José Antonio Muñoz Gámez, por ser un magnífico maestro además de un grandísimo amigo para toda la vida y al Dr. Francisco Javier Oliver Pozo por lo que he aprendido a su lado. Gracias por todo el apoyo recibido, sobre todo en los malos momentos, que a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral han sido muchos.

A la Dra. Paloma Muñoz de Rueda por su gran ayuda constante, porque sin ella nada sería posible. Gracias Palo, por ser la mejor jefa de laboratorio, por ser como eres, por ser el mejor ejemplo a seguir, por ser una de las mejores personas que he conocido y por ser una de mis mejores amigas.

A mis queridísimas “supernenas”, Ana Martín Álvarez y Laura Sanjuán Núñez, mis otras “yo”, tan distintas y tan parecidas a la vez. Gracias por vuestra grandísima ayuda, vuestro cariño, vuestra amistad y sobretodo por aguantarme cuando no me aguantaba ni a mí misma. No sé que haría sin vosotras, os quiero de todo corazón.

A todos mis maravillosos compañeros, tanto del laboratorio como a los de las reuniones de los martes, Jorge Casado, Pepi León, Ángel Carazo, a mi querido Luis Rodríguez, a mi querida Anita Gila, a mi Lola Quintero y a todos los demás, por los momentos de risas y lágrimas que hemos vivido y que espero que sigamos viviendo muchos años, todos juntos, como la gran familia que formamos. No puedo olvidarme de mi amiga Ester Pavón, recientemente incorporada a nuestro grupo, pero que después de varios años conociéndonos, debo agradecerle su gran ayuda en todos los momentos en los que la he necesitado.

Al resto de compañeros que he tenido a lo largo de este tiempo como David Martín Oliva, Andreína Peralta, Rocio Aguilar, José Manuel Rodríguez, Gustavo Ortiz y Rubén Romero por vuestra ayuda prestada al inicio de este trabajo.

A todos los demás compañeros y amigos del laboratorio de Investigaciones Médicas del Hospital Universitario San Cecilio, en especial a mis dos “Conchis”, Concepción Fernández España, Concepción Fernández Guerrero y a mi “Paqui”, Francisca Aguilar Torres, personal técnico del laboratorio por alegrarme los días que más lo necesitaba.

Mi mayor agradecimiento es para mi hija Rosa, gracias por tú sonrisa, gracias por tú amor, gracias por ser tan maravillosa y gracias por existir. Cariño, perdona los malos momentos que hayamos podido vivir y el tiempo que no he podido estar a tú lado, pero quiero que sepas que esta Tesis la he realizado gracias a tí y sólo por tí.

A mi padre Antonio y a mi madre Rosi, porque sin vosotros yo no soy nada. Por vuestro amor tan impresionante, vuestra ayuda, vuestro apoyo absoluto y por hacerme sentir siempre especial. Por haberme permitido realizar siempre lo que he querido y porque sólo os puedo decir que sois los mejores. También quiero agradecerles a mis maravillosos hermanos, David y Antonio, todo su apoyo y amor, y a mis cuñadas Mercedes y Merche, que para mí sois como mis hermanas. A mi otra niña, mi sobrina Paula, porque te quiero con locura. A mis primas Miriam, Carmen, Loli y Alicia, por vuestra ayuda, cariño y sabios consejos. Y a mi abuela, porque no puedo olvidarme de ti, porque estás en mi corazón y siempre estás conmigo.

Muchas gracias a la “Fundación Hospital Clínico” del Hospital Universitario San Cecilio de Granada por haberme facilitado la realización de esta Tesis Doctoral.

Gracias a la Red Nacional de Investigación en Hepatología y Gastroenterología (RNIHG) y al Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III) por sus ayudas económicas recibidas durante los años 2003-2006, así como al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd).

Este trabajo de tesis ha sido posible gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos de investigación:

- Implicación de la proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en la susceptibilidad a hepatocarcinogénesis: modelo en ratones PARP knockout. ENTIDAD FINANCIADORA: Red Nacional de Investigación en Hepatología y Gastroenterología (RNIHG). Esta Red está promovida y financiada por el Instituto de Salud Carlos III, en el contexto del VI Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico (2002-2006) de la Unión Europea. Red C03/02. INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Angeles Ruíz Extremera
- “Fisiopatología y nuevas formas de tratamiento de las enfermedades hepáticas, gastroenterológicas y pancreáticas”. ENTIDAD FINANCIADORA: Instituto de Salud Carlos III, N° expediente: PI051285. INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Javier Salmerón Escobar.



## **ÍNDICE**





<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1.- POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA 1</b> .....	<b>5</b>
1.1.- ESTRUCTURA DE LA PARP-1.....	6
1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1 .....	9
1.3.- SUSTRATOS DE POLI (ADP-RIBOSILACIÓN) .....	12
1.4.- FUNCIONES DE PARP-1 .....	14
<b>2.- ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE PARP-1</b> .....	<b>21</b>
2.1.- DESARROLLO DE RATONES DEFICIENTES EN PARP-1 .....	21
2.2.- DESARROLLO DE INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE PARP.....	22
<b>3.-CARCINOMA HEPATOCELULAR</b> .....	<b>27</b>
3.1.-DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ETIOLÍA DEL CHC .....	27
3.2.- DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE DEL CHC. ....	30
3.3.- TRATAMIENTO DEL CHC .....	34
3.4.- HEPATOCARCINOGENESIS.....	38
3.4.1- ALTERACIONES GENÉTICAS Y GENÓMICAS DEL CHC. ....	40
3.4.2- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL CHC. ....	42
<b>4.-PARP-1 Y CARCINOGENESIS</b> .....	<b>51</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	 <b>55</b>
 <b>PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO</b> .....	 <b>75</b>
 <b>CAPÍTULO I: LA TERAPIA COMBINADA DEL QUIMIOTERAPÉUTICO DOXORUBICINA E INHIBIDORES DE PARP-1 POTENCIAN LA MUERTE DE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO</b> .....	       <b>81</b>
<b>1.1.- RESUMEN</b> .....	<b>83</b>
<b>1.2.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>85</b>
<b>1.3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>89</b>
1.3.1.- CULTIVOS CELULARES .....	89

1.3.2.- DOXORUBICINA E INHIBIDORES DE PARP-1 .....	89
1.3.3.- ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR. ENSAYO MTT .....	90
1.3.4.- ANÁLISIS DE MUERTE CELULAR Y APOPTOSIS.....	90
1.3.5.- ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS .....	91
1.3.6.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	92
<b>1.4.- RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
1.4.1.- EL TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA INDUCE LA ACTIVACIÓN DE PARP-1 .....	95
1.4.2.- LA TERAPIA COMBINADA DE DOXORUBICINA E INHIBIDORES DE PARP DISMINUYEN LA VIABILIDAD, POTENCIANDO LA MUERTE CELULAR DE LÍNEAS TUMORALES DE CHC Y NO EN LÍNEAS NO TUMORALES. ....	96
1.4.3.- LA INHIBICIÓN DE PARP-1 SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS DE CHC, HepG2, A LA ACCIÓN DE DOXORUBICINA EN ENSAYOS A LARGO PLAZO .....	100
<b>1.5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>107</b>

## **CAPÍTULO II: LA INHIBICIÓN QUÍMICA DE PARP-1 CONFIERE RESISTENCIA A LA HEPATOCARCINOGÉNESIS EN UN MODELO DE RATONES PARP-1**

<b>PARENTALES. ....</b>	<b>115</b>
<b>2.1.- RESUMEN.....</b>	<b>117</b>
<b>2.2.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>119</b>
<b>2.3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>121</b>
2.3.1.- PROTOCOLO DE INDUCCIÓN QUÍMICA TUMORAL.....	121
2.3.2.- MEDIDAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR .....	121
2.3.3.- ESTUDIOS DE ACTIVACIÓN DE NF- $\kappa$ B .....	122
2.3.4.- OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES .....	124
2.3.5.- EXPRESIÓN DE GENES INDUCIDOS DURANTE CHC MEDIANTE RT-PCR	124
2.3.5.1.- EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL.....	124
2.3.5.2.- REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA.....	125
2.3.5.3.- REACCIÓN DE PCR A TIEMPO REAL .....	125
2.3.6.- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS .....	128
2.3.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO <sup>+</sup> .....	129
<b>2.4.- RESULTADOS.....</b>	<b>131</b>

2.4.1.- LA INHIBICIÓN DE PARP-1 DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN DE LOS HEPATOCITOS EN LAS FASES INICIALES DE LA HEPATOCARCINOGENÉNESIS .....	131
2.4.2.- LA INHIBICIÓN DE PARP PROVOCA DISMINUCIÓN DE INFLAMACIÓN EN LAS FASES INICIALES DE LA HEPATOCARCINOGENÉNESIS DEBIDO A UNA DEFICIENTE ACTIVACIÓN DE NF-kB .....	132
2.4.3.- EL TRATAMIENTO CON EL INHIBIDOR DE PARP REPRIME LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA DE MARCADORES TUMORALES DE HEPATOCARCINOGENÉNESIS. ....	134
2.4.4.- LA TERAPIA CON INHIBIDORES DE PARP NO ALTERA LAS ESTRUCTURAS MORFOLÓGICAS DEL HÍGADO. ....	137
<b>2.5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>139</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>

**CAPÍTULO III: LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1 MODULA LA EXPRESIÓN GÉNICA EN XENOGRAFOS TUMORALES DE HEPATOCARCINOMA HUMANO.. ..... 149**

<b>3.1.- RESUMEN.....</b>	<b>151</b>
<b>3.2.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>153</b>
<b>3.3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>157</b>
3.3.1.- PROTOCOLO DE CARCINOGENÉNESIS HEPÁTICA HUMANA EN UN MODELO DE RATONES DESNUDOS O INMUNOSUPRIMIDOS .....	157
3.3.2.- EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y PRECIPITACIÓN DEL ARN TOTAL.....	158
3.3.3.- MICROARRAYS DE EXPRESIÓN DE AFFYMETRIX .....	159
3.3.3.1- SÍNTESIS DEL ADNC MEDIANTE EL KIT “GENECHIP® ONE-CYCLE CDNA SÍNTESIS KIT” (AFFYMETRIX).....	159
3.3.3.2- SÍNTESIS DE ARNC BIOTINILADO MEDIANTE EL KIT “GENECHIP® IVT LABELING KIT”(AFFYMETRIX).....	160
3.3.3.3- HIBRIDACIÓN CON EL GENECHIP HUMAN GENOME U133 PLUS 2,3 (AFFYMETRIX).....	161
3.3.3.4- ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LA HIBRIDACIÓN CON MICROARRAYS.....	163
3.3.4.- PCR EN TIEMPO REAL.....	163

3.3.5.- ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS XENÓGRAFOS TUMORALES DE HEPG2.....	166
3.3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	166
<b>3.4.- RESULTADOS.....</b>	<b>167</b>
3.4.1.- LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP DISMINUYE EL VOLUMEN DE LOS XENÓGRAFOS DERIVADOS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO .....	167
3.4.2.- EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS XENÓGRAFOS TUMORALES DE HEPATOCARCINOMA HUMANO. ....	170
3.4.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DEPENDIENTE DE PARP-1 EN LOS XENÓGRAFOS TUMORALES DE HEPATOCARCINOMA HUMANO .....	174
3.4.4.- EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE PARP-1 .....	176
3.4.5.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	189
<b>3.5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>195</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>203</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>207</b>
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>213</b>
<b>COMUNICACIONES A CONGRESOS.....</b>	<b>247</b>

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## **RESUMEN**

El presente trabajo de tesis doctoral se centra en el estudio de la proteína PARP-1 como una nueva diana en la terapia frente al cáncer hepático por su implicación en la regulación de la transcripción y sus consecuencias en la inflamación y carcinogénesis. Las investigaciones se han realizado en modelos *in vitro*, sobre líneas tumorales de hepatocarcinoma humano, e *in vivo*, sobre ratones parentales y ratones inmunosuprimidos.

Nuestros resultados revelan que PARP-1 resulta ser una diana molecular idónea en la terapia antitumoral. La utilización de inhibidores específicos de PARP-1 son capaces de potenciar el efecto citotóxico del agente quimioterapéutico doxorubicina, ampliamente utilizado en oncología. Además, la inhibición de PARP-1 presenta una acción preventiva de los daños hepáticos producidos por carcinógenos químicos. Por otro lado, la regulación de la transcripción génica por PARP-1, implica directamente a esta proteína con la hepatocarcinogénesis. La inhibición específica de PARP-1 en un modelo *in vivo* de carcinoma hepatocelular, mediante el uso de inhibidores farmacológicos, provoca una reducción de la proliferación de las células tumorales y del volumen tumoral, además de inhibir la expresión de una gran cantidad de genes relacionados con cáncer, angiogénesis y metástasis.

En resumen, podemos concluir que PARP-1 nos resulta una diana idónea frente al carcinoma hepatocelular, tanto por su implicación en las patologías de origen inflamatorio, entre las que se puede considera a esta neoplasia, como por su capacidad en la regulación de la transcripción de genes muy implicados en la oncogénesis.

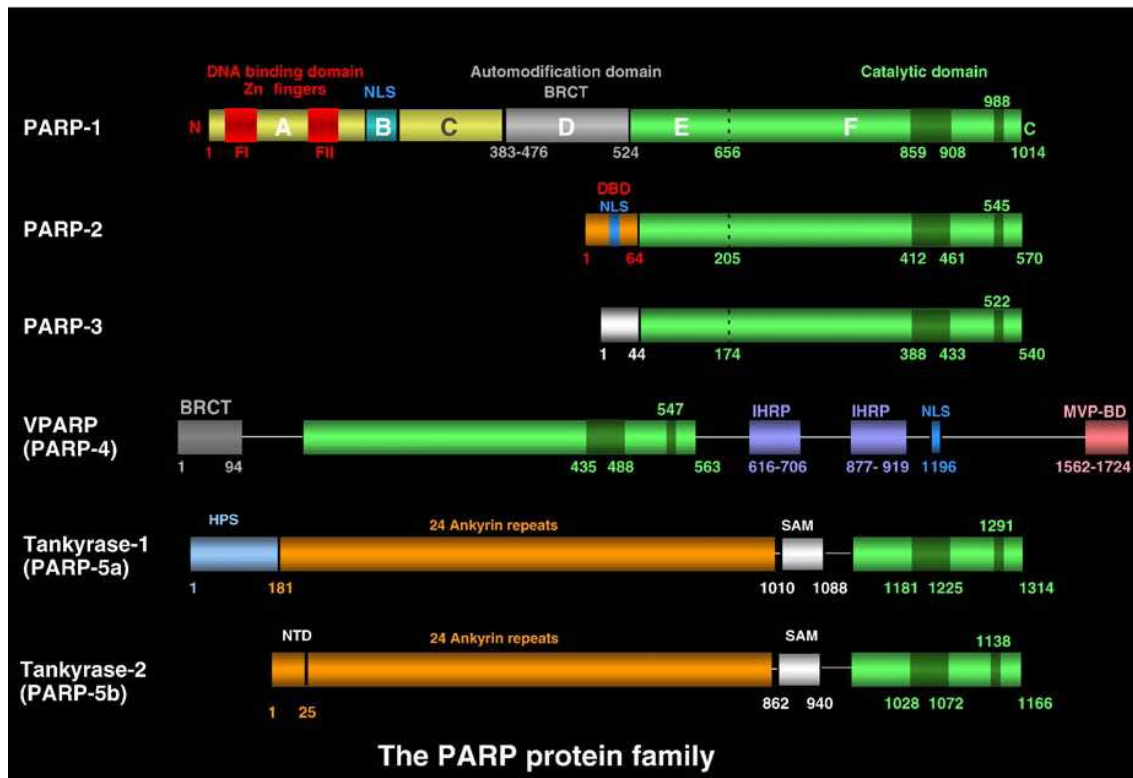




# **INTRODUCCIÓN**

## ***1.- POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA 1.***

Las Poli (ADP-ribosa) Polimerasas, también conocidas como poli (ADP-ribosa) sintetasas y poli (ADP-ribosa) transferasas, constituyen una familia de enzimas de señalización celular presentes en eucariotas, que catalizan la poli (ADP-ribosilación) de proteínas de unión al ADN. Después de cuatro décadas del descubrimiento de la reacción de poli (ADP-ribosilación) (Chambon et al, 1963), se han identificado hasta la fecha 18 enzimas que presentan homología de secuencia con el dominio catalítico del principal miembro fundador de esta familia, la Poli (ADP-ribosa) Polimerasa-1 (PARP-1; EC2.4.2.30) [Figura 1]. La PARP-1, codificada por el gen ADPRT, es una enzima nuclear altamente expresada que cataliza la transferencia de monómeros de ADP-ribosa obtenidos del sustrato  $\text{NAD}^+$ , sobre los grupos carboxílicos de los aminoácidos glutámico y aspártico (Suzuki et al, 1986) de una serie de proteínas aceptores nucleares. PARP-1 es una enzima de reconocimiento del daño en el ADN que participa activamente en los procesos de reparación de daños de cadena simple y doble. PARP-1 se activa principalmente en respuesta a daños en el ADN inducidos por diferentes agentes genotóxicos como radiación ionizante, agentes alquilantes y oxidantes, aunque recientemente han sido descritos otros estímulos diferentes, como ciertos procesos infecciosos, estrés y hormonas derivadas de esteroides, como activadores de la enzima en lugares muy específicos de los cromosomas (Gordon-Shaag et al, 2003; Tulin and Spradling, 2003). La modificación transitoria de proteínas nucleares por poli-ADP-ribosilación, constituye un tipo de modificación post-traducciona l necesaria para la activación así como desactivación de una serie de procesos celulares.



**Figura 1.- Dominios estructurales de algunos miembros de la familia PARPs.** La proteína PARP-1 es el fundador y principal miembro de esta familia con cuatro dominios estructurales perfectamente descritos funcionalmente. La proteína PARP-2 presenta un 69% de homología con el dominio catalítico de PARP-1, con algunas diferencias en su dominio de automodificación. La proteína PARP-3 está asociada con el centrosoma. La proteína PARP-4 o VPARP es el miembro de mayor tamaño de esta familia cuya función no está bien definida, pero se cree que participa en el transporte celular y pueden estar asociadas a la resistencia a drogas en algunas líneas celulares (Kickhoefer VA. et al, 1999; Scheffer GL. et al, 2000; Liu X. et al, 2004). Las tanquirasas 1 y 2 están asociadas con las proteínas teloméricas (Smith S. et al, 1998; Cook BD. et al, 2002; Sbodio JI. et al, 2002) y posiblemente tengan funciones que se solapan en la homeostasis del telómero y en el tráfico de vesículas (Smith S. and de Lange T., 2000; Chang P. et al, 2005; Seimiya H., 2006).

### 1.1.- ESTRUCTURA DE LA PARP-1.

PARP-1 es una proteína de 113 kDa de peso molecular cuya estructura está dividida en seis dominios estructurales [Figura 2 (A)], de los cuales, sólo cuatro están perfectamente descritos funcionalmente:

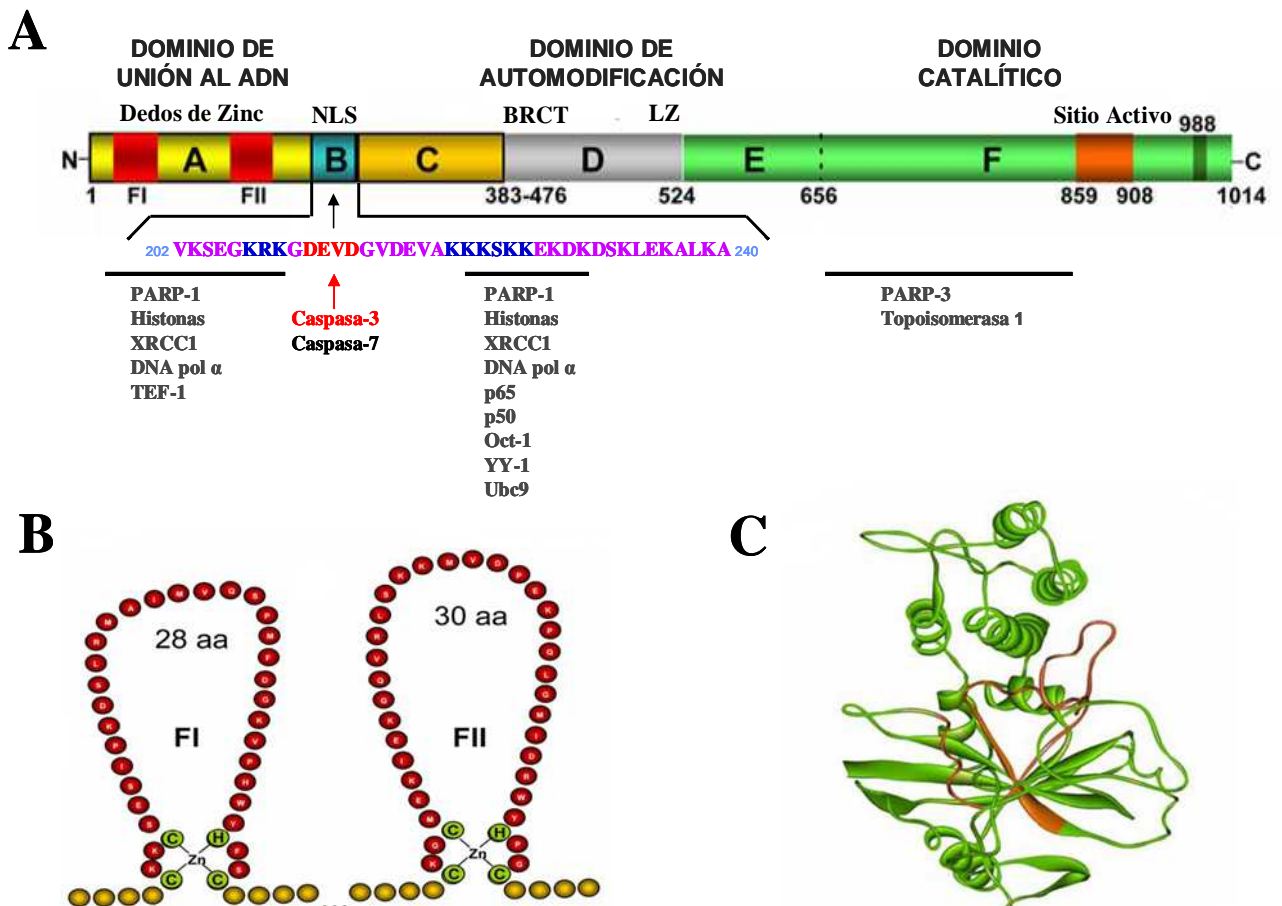
1. El *dominio A*, dominio de unión al ADN (DBD, DNA Binding Domain) de 46-kDa localizado en el extremo N-terminal. Este dominio presenta dos estructuras en dedos de zinc (denominadas FI y FII) [Figura 2 (B)], mediante

las cuales se produce la interacción de PARP-1 con el ADN estimulando la actividad catalítica del enzima (Lindahl et al. 1995; Caldecott et al. 1996).

2. El **dominio B**, donde se encuentra la secuencia de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Sequence), responsable del emplazamiento nuclear de PARP-1. Además, este dominio contiene la secuencia aminoacídica DEVD reconocida por las caspasas-3 y -7 y sobre la cual se realiza el corte proteolítico ejercido por estas enzimas en la muerte celular apoptótica. Este proceso es uno de los eventos más tempranos de la apoptosis y es utilizado como marcador de dicha muerte celular (Kaufmann et al. 1993; Lazebnik et al. 1994).
  
3. El **dominio D**, dominio de automodificación de 22-kDa. PARP-1 es el principal aceptor de polímero de ADP-ribosa (Kawaichi et al. 1981; Kreimeyer et al. 1984) y es en esta posición rica en residuos de glutamato donde se produce la automodificación de PARP-1 por poli (ADP-ribosilación). Este cambio post-transduccional incide negativamente en la actividad del enzima por repulsión electrostática entre la proteína modificada y el ADN dañado (D'Amours et al. 1999). Otro motivo de gran importancia es el denominado cremallera de leucina (Leucine zipper), responsable de interacciones proteína-proteína en reacciones de homo- y/o heteromodificación. También incluye el motivo BRCT (Breast cancer susceptibility protein, BRCA1, C-terminus) responsable de la interacción con proteínas de respuesta a daños en el ADN [XRCC1, histonas y DNA Polimerasa  $\beta$  (Nash RA. et al. 1997; Masson et al. 1998)] y con factores de transcripción [NF-Kb, Oct-1, Ying-Yang-1 (Nie et al. 1998; Griesenbeck et al. 1999)].
  
4. El **dominio F**, también conocido como dominio catalítico, de 54-kDa. Se localiza en el extremo C-terminal y es el responsable de la actividad de la enzima transformando residuos de  $\text{NAD}^+$  en largos y ramificados polímeros de poli ADP-ribosa sobre proteínas nucleares aceptoras. Presenta una alta homología con otras mono-ADP-ribosil transferasas, con una estructura terciaria altamente conservada en las cuales se alternan estructuras de láminas  $\beta$  con hélices  $\alpha$  sobre las cuales se realiza la unión con el  $\text{NAD}^+$  [Figura 2 (C)]. Esta alta homología ha permitido definir la denominada “firma de PARP-1”

mediante la cual se ha podido establecer una familia de proteínas PARP actualmente formada por 18 miembros (Ame et al. 2004). Aunque no se conoce la función biológica de muchos de los miembros de esta familia, si es posible sugerir que su existencia puede estar relacionada con un importante proceso de poli-ADP-ribosilación en múltiples funciones celulares.

- Los *dominios C y E*, son los peor descritos hasta la fecha y carecen de una actividad biológica conocida. En el dominio C se localizan los motivos HTH (Helix Turn Helix), descritos como dominios de unión de proteínas al ADN. A través de estos motivos HTH se cree que PARP-1 puede interaccionar con el ADN no dañado, sin que por ello se produzca la activación catalítica de la proteína (D'Amours et al. 1999).



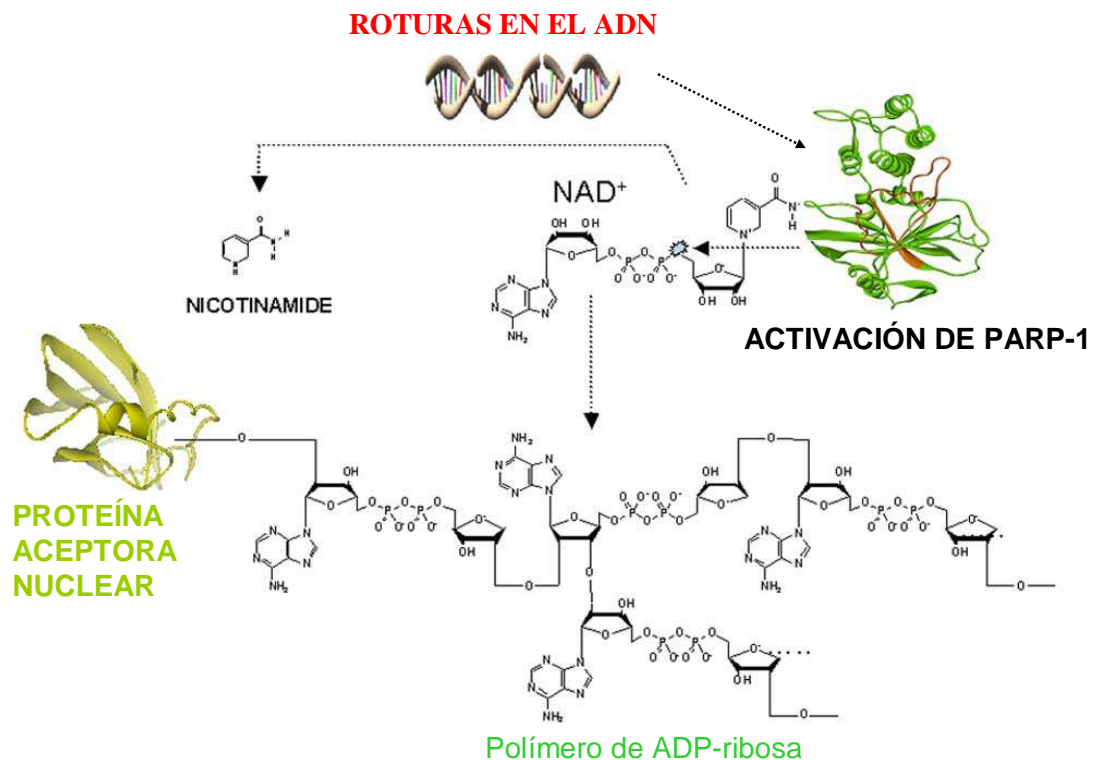
---

**Figura 2.- Dominios estructurales de PARP-1.** (A) Dominios estructurales de PARP-1: Dominio de unión al ADN (DBD); FI y FII, estructuras en dedos de zinc; secuencia de localización nuclear (NLS); dominio de automodificación y dominio catalítico. Motivo BRCT (BRCA1 like C-terminus); lugar de corte de las caspasas-3 y -7; motivo cremallera de leucina (LZ, Leucine zipper). Además se indican los posibles sitios de interacción con otras proteínas. (B) Estructuras en dedo de zinc del dominio de unión al ADN responsables de la unión al ADN y de interacciones proteína-proteína. (C) Diagrama del dominio catalítico de PARP-1 (del aminoácido 656 al 1014) que contiene el sitio activo de PARP-1 altamente conservado en eucariotas (del aminoácido 859 al 908) (Cepeda et al, 2006).

---

## ***1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1.***

PARP-1 es una enzima de detección de daños en el ADN con capacidad de unirse tanto a roturas simples como dobles de cadena, producidas por agentes genotóxicos como la radiación ionizante, los radicales libres, los inhibidores de la topoisomerasa I y II y los agentes alquilantes. Además, actúa como una proteína de señalización a los complejos de reparación del daño inducido en el ADN. Tras detectar el daño y unirse a él a través de las estructuras en dedos de zinc presentes en el dominio de unión al ADN, PARP-1 se activa y forma homodímeros principalmente a través de la estructura FII (segundo dedo de zinc) y cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) en nicotinamida y monómeros de ADP-ribosa que posteriormente utilizará como sustrato para formar largos y ramificados polímeros de poli (ADP-ribosa) sobre residuos  $\gamma$ -carboxilo de ácido glutámico y ácido aspártico de determinadas proteínas nucleares mediante enlace éster [Figura 3]. El tamaño del polímero sintetizado varía desde unas pocas unidades hasta la unión de más de 200 monómeros unidos por enlaces O-glicosídicos de dos unidades de ribosa entre los carbonos 1'' $\rightarrow$ 2' formando de este modo la cadena lineal del polímero. Las ramificaciones sobre la cadena lineal se realizan mediante enlaces glicosídicos 2'' $\rightarrow$ 1'' entre dos unidades de ribosa (de Murcia et al. 1994; Schreiber et al. 1994; Lindahl et al. 1995; Schreiber et al. 1995; Burkle, 2000; Burkle, 2001; Virag and Szabo 2002).



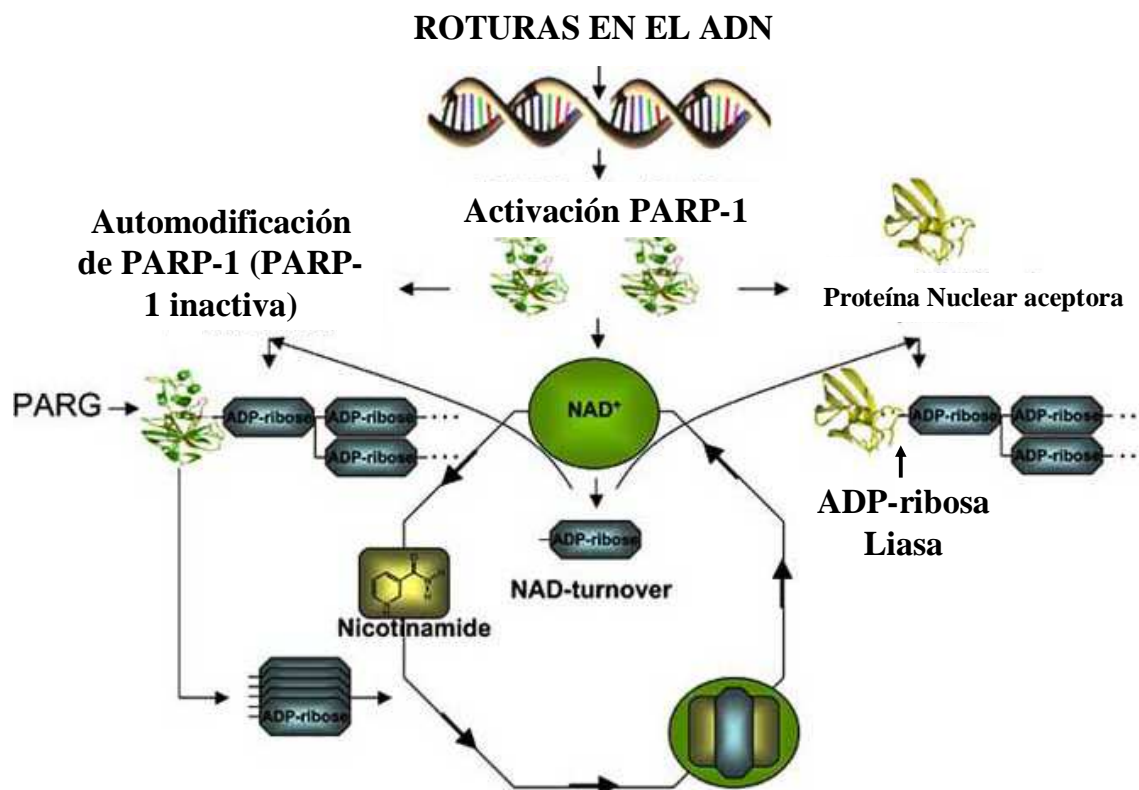
**Figura 3.- Mecanismo de activación de PARP-1 tras daño en el ADN.** Determinados agentes genotóxicos, como radiaciones ionizantes, agentes alquilantes, radicales libres, activan PARP-1. De un modo esquematizado se muestra el proceso de activación, síntesis del polímero a partir del sustrato  $\text{NAD}^+$  y la consiguiente modificación post-traduccional de determinadas proteínas nucleares (histonas H1, H2B; lámina B; topoisomerasas I y II; PARP-1; Complejo de Reparación por Excisión de Bases o BER...)

Por lo tanto, la proteína PARP-1 está dotada de tres actividades enzimáticas diferentes, que le permiten la formación del polímero previamente descrito (Alvarez-Gonzalez et al. 1999):

1. Actividad de **mono-ADP-ribosilación del sustrato (iniciación)**, mediante la cual se produce el anclaje del primer monómero de ADP-ribosa al grupo carboxílico del sustrato mediante enlace tipo éster.
2. Actividad de **elongación** del polímero mediante la incorporación de las unidades de ADP-ribosa mediante enlace glicosídico  $\alpha$  1'' $\rightarrow$ 2'.
3. Actividad de **ramificación**, esta se produce de forma irregular con una pauta de una ramificación por cada 20-50 unidades de ADP-ribosa de la cadena principal, mediante enlace glicosídico 2'' $\rightarrow$ 1'' (Alvarez-Gonzalez et al. 1999; Kraus and Lis 2003).

La poli ADP-ribosilación de proteínas es un proceso dinámico con una vida media del polímero inferior a un minuto (Whitacre et al. 1995). El rápido catabolismo de los polímeros es debido a la acción de dos enzimas: la *poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa o PARG* dotada de actividad exoglicosidasa y endoglicosidasa la cual actúa degradando el polímero tanto por los extremos como por el interior del mismo (D'Amours et al. 1999; Davidovic et al. 2001), y la *ADP-ribosil proteína liasa* encargada de la escisión del enlace éster entre la proteína modificada y el primer monómero de ADP-ribosa (D'Amours et al. 1999; Davidovic et al. 2001; Kraus and Lis 2003) [Figura 4].

La poli ADP-ribosilación de proteínas ejercida por PARP-1 constituye un proceso rápido pero transitorio de modificación covalente de proteínas, que permite modificar su actividad biológica en un momento determinado.



**Figura 4.- Enzimas implicadas en el catabolismo de la proteína PARP-1.** Las enzimas PARG y la ADP-ribosa ligasa son las encargadas del rápido catabolismo de los polímeros de ADP-ribosa sintetizados tras la activación de PARP-1. La activación de PARP-1 también conduce a la automodificación de PARP-1 por ADP-ribosilación que conduce a la inhibición de PARP-1.



### ***1.3.- SUSTRATOS DE POLI (ADP-RIBOSILACIÓN).***

La activación de la proteína PARP-1 produce la modificación post-traduccional de una serie de proteínas aceptoras nucleares implicadas en diversas funciones biológicas, destacando a las proteínas implicadas en los procesos de reparación del ADN como principales aceptores. Los niveles constitutivos de polímero en células sin daños en el ADN, son relativamente bajos, sin embargo, tras la inducción del daño, la actividad del enzima se eleva considerablemente y los niveles de polímero aumentan entre 10 y 500 veces con respecto a su nivel basal.

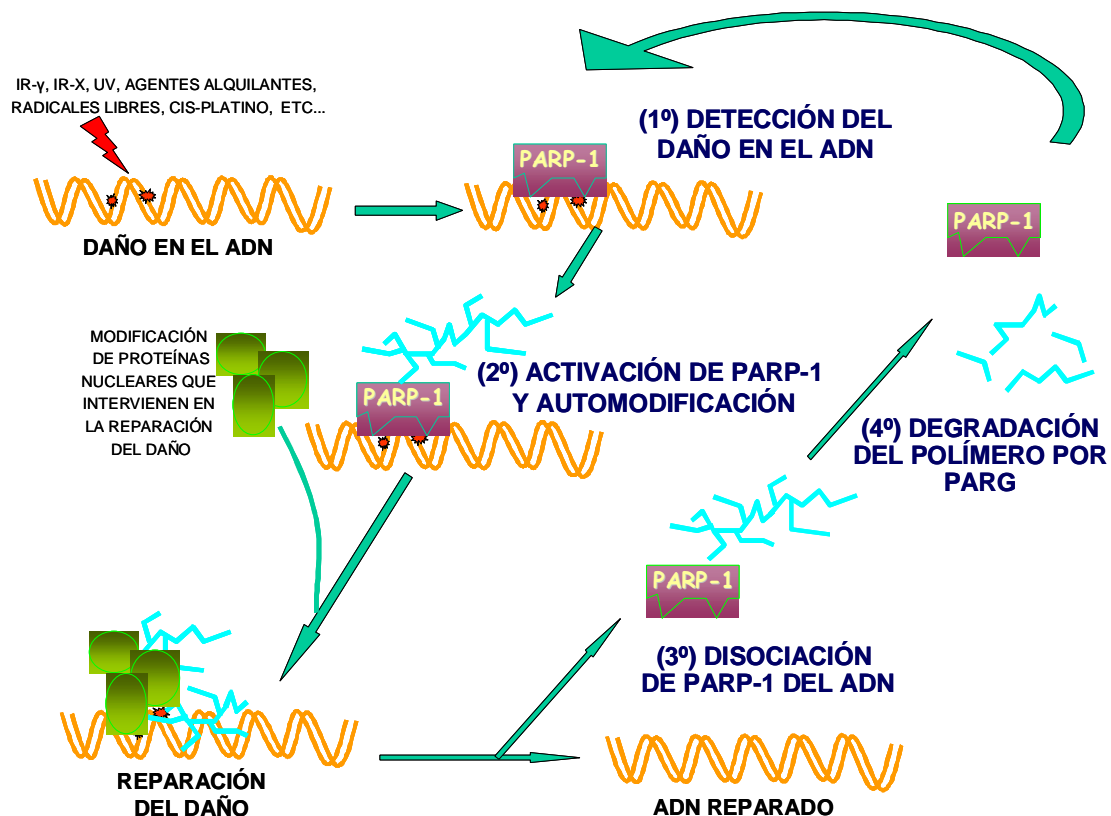
*In vivo*, la proteína más abundantemente poli (ADP-ribosilada) es la propia PARP-1. Esta enzima se encuentra sometida a un proceso de automodificación que regula su actividad enzimática y su unión al ADN. La regulación de la actividad de PARP-1 ha sido explicada por diferentes mecanismos. El mejor caracterizado es el **mecanismo de automodificación** propuesto por Kawaichi en un principio (Kawaichi et al, 1981), y revisado posteriormente por D'Amours (D'Amours et al, 1994) [Figura 5]. Este modelo de activación-regulación de PARP-1 se basa en la transferencia de carga eléctrica sobre la proteína PARP-1 a través de los grupos fosfato presentes en el polímero ejerciendo, esta carga neta negativa, fuerzas electrostáticas entre la proteína modificada y el ADN, llevando a la inactivación de PARP-1 y su separación del ADN. A continuación, las enzimas encargadas del catabolismo del polímero (PARPG y ADP-ribosa proteína liasa), proceden a su hidrólisis. De este modo PARP-1 está de nuevo lista para posteriores ciclos de activación en respuesta a daños en el ADN.

Además de PARP-1 se han descrito numerosos aceptores de poli (ADP-ribosilación) entre los que destacamos:

- ***Proteínas implicadas en la arquitectura de la cromatina*** como las histonas y las proteínas HMG (high mobility group), constituyendo el principal conjunto de proteínas modificadas por poli (ADP-ribosilación) junto con la propia PARP-1 (Tanuma et al, 1985; Virag and Szabo, 2002). La modificación de las histonas, a través de la carga eléctrica transferida por el polímero, provoca una repulsión electrostática entre el ADN y las mismas. Las fuerzas de repulsión originan una distensión de la cromatina en esa localización del ADN y permite la entrada de los complejos de reparación en el caso de que el motivo de activación de PARP-1 sean daños producidos en el ADN. Además, se ha descrito la implicación de

PARP-1 en transcripción génica; la modificación de las histonas y la distensión de estas regiones del ADN facilitan la entrada de los complejos de transcripción convirtiendo dichas zonas en transcripcionalmente activas.

➤ **Factores de transcripción, factores de replicación de ADN y moléculas de señalización** tales como NF-κB (Oliver et al, 1999), AP-2 (Kannan et al, 1999), Oct-1, YY1 (Oei et al, 1997), B-MYB (Cervellera and Sala, 2000), DNA-dependent protein kinase (Ariumi et al, 1999), p53 (Wesierska-Gadek and Schmid, 2001), topoisomerasa I, lamina B y B23.



**Figura 5.- Modelo de activación y regulación de PARP-1.** (1) Tras el daño en el ADN PARP-1 se une al mismo y se activa; (2) Una vez activa, PARP-1 produce la modificación de las proteínas aceptoras y de ella misma; (3) Tras su automodificación, PARP-1 se inactiva y se separa del ADN, permitiendo la entrada del complejo reparador; (4) El polímero es rápidamente degradado por la acción de PARG, completándose el ciclo y quedando PARP-1 lista para el siguiente.

#### ***1.4.- FUNCIONES DE PARP-1.***

El desarrollo de ratones deficientes en PARP-1 y el uso de inhibidores farmacológicos de esta proteína, cada vez más potentes y específicos, han permitido establecer el papel biológico de PARP-1 y de la poli (ADP-ribosilación). De este modo, se ha podido demostrar que PARP-1 está implicada en procesos de reparación del ADN, muerte celular, transcripción génica y respuesta inflamatoria (Shall and de Murcia, 2000). Gracias al papel de PARP-1 en la regulación de la transcripción y sus consecuencias en la inflamación y carcinogénesis, esta proteína está siendo estudiada como una potente diana en la terapia frente al cáncer que estudiaremos con detenimiento en este trabajo de tesis.

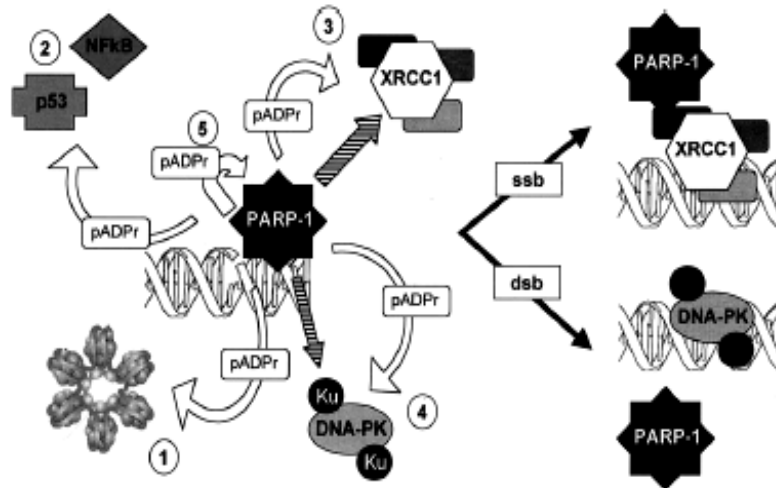
Por tanto, las principales funciones de PARP-1 en los diferentes procesos celulares son:

1.- ***Procesos de reparación del ADN y mantenimiento de la integridad genómica:*** En los procesos de reparación de daños de cadena simple en el ADN, a través del complejo de reparación por escisión de bases (BER, Base Escisión Repair) o mediante el sistema de reparación de daños de cadena simple (SSBR, Single Strand Break Repair), PARP-1 participa en el reclutamiento y regulación funcional de las proteínas XRCC1, DNA-polimerasa  $\beta$  y DNA ligasa III, que forman parte de estos complejos de reparación, por modificación por poli (ADP-ribosilación) y por interacción directa proteína-proteína, formando de esta manera parte del complejo de reparación por escisión de bases [Figura 6] (Leppard et al, 2003, Ame et al. 2004). Además, PARP-1 modifica de forma transitoria por ADP-ribosilación, proteínas involucradas en la estructura de la cromatina, especialmente histonas y las proteínas HMG (High Mobility Group), produciendo alteraciones en la estructura de la cromatina en los lugares del ADN dañados facilitando de este modo la reparación (D'Amours et al. 1999).

Respecto a la reparación de daños de cadena doble del ADN, PARP-1 participa a través de sistema de reparación no homologa, regulando el funcionamiento de la proteína de reparación DNA-PK mediante modificación post-transcripcional por poli (ADP-ribosilación) de esta proteína [Figura 6] (Chalmers et al. 2004).

El papel de PARP-1 en el mantenimiento de la integridad genómica se ha demostrado a través de numerosos trabajos en los que la deficiencia de PARP-1 o su

inhibición ha producido retrasos en el sistema de reparación por escisión de bases o BER y una alta frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, en modelos murinos y en líneas celulares expuestas a radiación ionizante o tratadas con agentes alquilantes (de Murcia et al. 1997).



**Figura 6.- PARP-1 y reparación.** (1) PARP-1 modifica a las histonas y produce relajación de la cromatina en las zonas dañadas. (2) p53 es modificada por poli (ADP-ribosilación) en respuesta a daños en el ADN. (3) PARP-1 participa en BER (*Base Excisión Repair*), tanto por modificación de sus componentes como por interacción directa con los mismos. (4) Modificación de DNA-PK por el polímero como consecuencia de roturas dobles de cadena. (5) Automodificación de PARP-1 que implica pérdida de afinidad por el ADN (Chalmers et al, 2004).

**2.- Regulación de la replicación:** numerosos estudios indican que PARP-1 interviene en la replicación aunque el mecanismo no se conoce con exactitud. Durante la replicación del material genético el metabolismo de la poli-ADP-ribosa se encuentra acelerado en el núcleo celular (Tanuma et al 1978; Kanai et al, 1981; Leduc et al, 1988; Bakondi et al, 2002). Otros estudios indican que PARP-1 forma parte del multicomplejo proteico encargado de la replicación (MRC, Multiprotein Replication Complex)(Simbulan-Rosenthal et al. 1996). En este sentido, se sabe que PARP-1 se co-purifica junto a las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\beta$ , DNA primasa, DNA helicasa, DNA ligasa, topoisomerasas I y II (Simbulan-Rosenthal et al. 1996; Dantzer et al. 1998; Bauer et al. 2001). Además se conoce que algunas de estas proteínas como las topoisomerasas I y II, y DNA polimerasa  $\alpha$  sufren, además, modificaciones por poli-ADP-ribosilación. Otro mecanismo por el cual PARP-1 puede regular nucleares es por la poli (ADP-

ribosilación) de histonas facilitando la entrada del complejo de reparación del ADN (Boulikas , 1990).

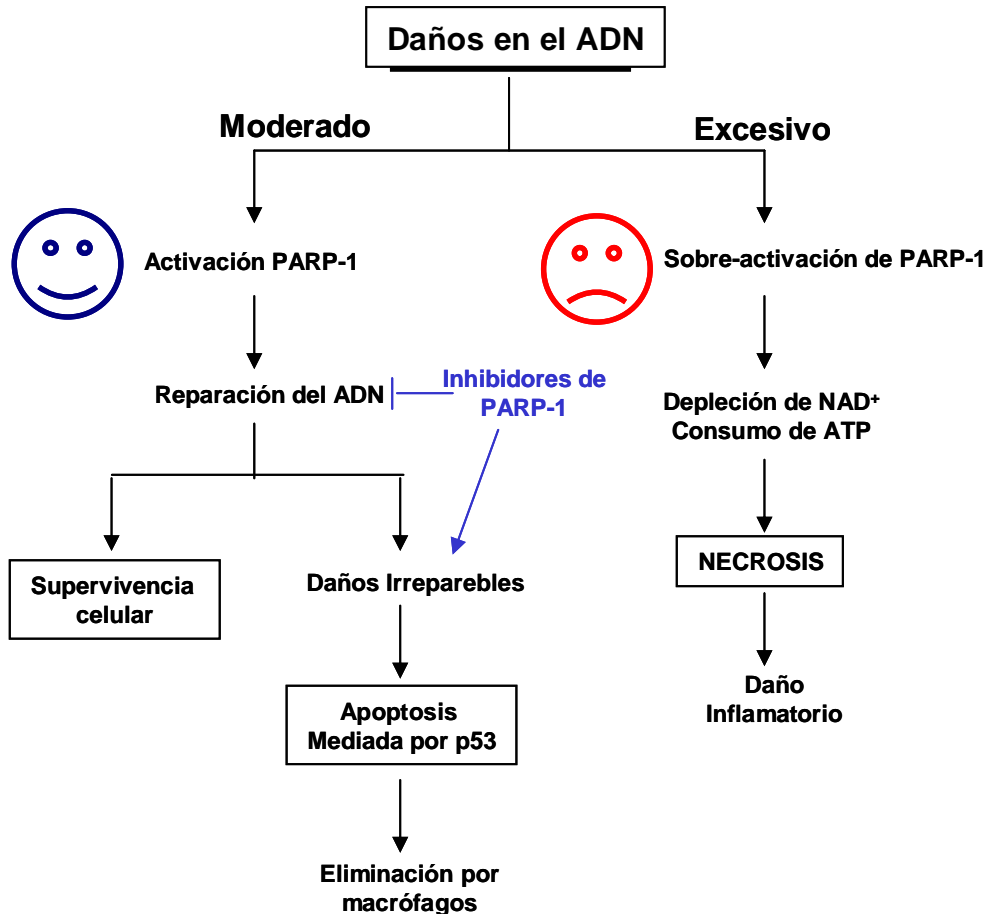
3.- ***Papel en la muerte celular:*** PARP-1 es uno de los primeros sustratos de las caspasas, principales responsables de la apoptosis (Kaufmann et al. 1993; Lazebnik et al. 1994; Germain et al. 1999). Como vimos en el apartado de la estructura de PARP-1 [Figura 2A], en el dominio B se encuentra el motivo DEVD, el cual es reconocido por las caspasas -3 y -7 que fragmentan a la PARP-1 en dos fragmentos de 89 y 24 kDa, separando el dominio de unión del dominio catalítico e inactivando a la enzima. Este hecho es utilizado en el laboratorio como marcador de la muerte celular por apoptosis.

PARP-1 también está relacionada con la muerte celular por necrosis. La necrosis a diferencia de la apoptosis es un proceso pasivo, caracterizado por la rotura de la membrana plasmática y salida del contenido celular al medio extracelular provocando o desencadenando una respuesta inflamatoria. La carga energética de la célula es determinante para que la célula muera por necrosis o apoptosis, de este modo una activación elevada de PARP-1 produce un consumo excesivo de NAD<sup>+</sup> y por lo tanto un gran consumo de ATP, lo que provoca un colapso energético y a la muerte celular por necrosis. Numerosos estudios realizados en modelos experimentales relacionan la sobre-activación de PARP-1 como causante de los procesos necróticos que conducen a determinadas condiciones patológicas, tales como en procesos inflamatorios e isquémicos (Szabo and Dawson, 1998; Pieper et al, 1999; Virag and Szabo, 2002). En este sentido PARP-1 ha sido descrita como un interruptor entre apoptosis y necrosis, a través de la modulación del contenido energético celular [Figura 7] (Los et al. 2002; Virag and Szabo 2002).

Otros estudios han demostrado que PARP-1 juega un papel crucial en los procesos de muerte programada dependiente de AIF e independiente de caspasas (Yu et al. 2002; Wang et al, 2003; Yu et al, 2003). El polímero sintetizado por PARP-1 es capaz de iniciar una señal nuclear que se transloca hasta la mitocondria, por mecanismos aún desconocidos, e induce la liberación del factor AIF. El AIF es una proteína de 67 KDa localizada en el espacio intermembranoso mitocondrial, desde donde se dirige al núcleo y provoca la condensación periférica de la cromatina y la fragmentación del DNA a gran escala (fragmentos > 50 KDa).

Además hay que señalar la potenciación de los efectos citotóxicos de agentes antitumorales que basan su acción en la inducción de daños en el ADN, mediante el uso

de inhibidores químicos de PARP-1. Este resultado se debe a defectos en los procesos de reparación tras el uso de inhibidores y nos presentan a PARP-1 como un potencial blanco de investigación frente al tratamiento antitumoral.



**Figura 7.- Implicación de PARP-1 en la supervivencia, apoptosis o necrosis.** Esquema de los posibles eventos celulares en los que está implicada PARP-1 dependiendo de las concentraciones celulares de  $\text{NAD}^+$  y de ATP (Virag and Szabo, 2002).

4.- **Regulación de la transcripción génica:** Se ha demostrado que PARP-1 es capaz de unirse a estructuras del ADN en ausencia de daños (Kun et al, 2002). Además, también se ha demostrado que PARP-1 interacciona con diferentes factores de transcripción (Oei et al, 1997; Hassa and Hottiger, 1999; Wesierska-Gadek and Schmid, 2001; Hassa et al, 2003). Estos hechos postularon un posible papel de PARP-1 en la regulación de la transcripción génica. Actualmente se conoce que PARP-1 puede

regular dicho proceso mediante tres mecanismos no excluyentes entre sí, como muestra la figura 8, detallados a continuación:

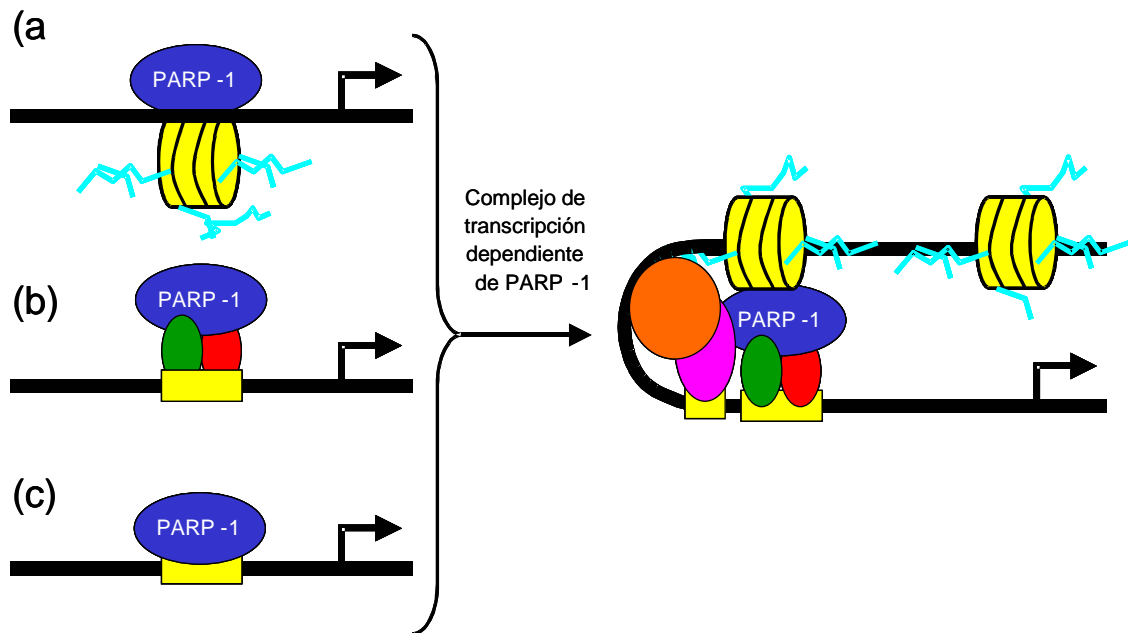


Figura 8: Mecanismos de la regulación de la transcripción por PARP-1 (Kraus and Lis, 2003).

1. **Mediante la alteración de la cromatina:** PARP-1 es capaz de modificar de forma transitoria la estructura de la cromatina a través de la poli (ADP-ribosilación) de las proteínas esenciales para su ensamblaje como son las histonas y las proteína HMG (D'Amours et al, 1999). La alteración estructural de la cromatina permite la descondensación y accesibilidad al ADN de las proteínas implicadas en el inicio de la transcripción [Figura 8.A].
2. **Interacción con factores de transcripción:** En la activación de la transcripción, además de la descondensación de la cromatina, es necesaria la presencia de factores de transcripción específicos. En este sentido se ha visto que, PARP-1 regula la actividad de diversos factores de transcripción como YY1, OCT-1, SP-1, NF-kB, P53, CREB, AP-1, AP-2, B-MYC, E2F-1, TEF-1 y HSF-1 (Rawling and Alvarez-González, 1997; Oei et al, 1997; Butler and Ordahl et al, 1999; Oliver et al, 1999; Hassa and Hottiger, 1999; Hassa et al, 2003; Andreone et al, 2003) a distintos niveles. PARP-1 puede modificar algunos de estos factores de transcripción, los cuales actuarían como sustratos

de ADP-ribosilación, y de este modo PARP-1 modificaría la capacidad de dichos factores para unirse a las secuencias promotoras de los genes, siempre y cuando estos factores no se encuentren ya unidos al ADN, en cuyo caso ya no podrían ser modificados por la proteína. Otra serie de factores de transcripción no requieren la modificación transitoria producida por PARP-1, pero sí su interacción física con el enzima. Por tanto, en este último caso PARP-1 actuaría como un co-activador de los factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B, AP-2, B-MYC, E2F-1, en cuyos casos la interacción estabiliza y aumenta su unión al ADN, favoreciendo de este modo la activación de los factores de transcripción y aumentando la expresión de los genes controlados por estos factores (Kannan et al, 1999; Simbulan-Rosenthal et al, 2000; Cervellera and Sala, 2000; Oliver et al, 1999; Hassa et al, 2001) [Figura 8.B].

3. ***Unión a secuencias reguladoras o promotoras del ADN:*** PARP-1 puede ser reclutada a la región promotora de ciertas secuencias del ADN de dos modos, reconociendo ciertas estructuras o interaccionando con otros factores de unión al ADN (Nie et al, 1998; Butler and Ordahl et al, 1999; Plaza et al, 1999; Akiyama et al, 2000; Nirodi et al, 2001; Ha et al, 2002). Sólo en algunos casos, para esta interacción, se requiere la actividad enzimática de PARP-1 (Butler and Ordahl, 1999; Miyamoto et al, 1999; Nirodi et al, 2001), mientras que en otros casos su función es independiente de esta actividad, actuando entonces PARP-1 como un clásico regulador de la transcripción de ciertos promotores (Meisterernst et al, 1997; Anderson et al, 2000; Cervellera and Sala, 2000; Hassa and Hottiger, 2002) [Figura 8.C].

En resumen, podemos decir que la capacidad de PARP-1 de modular la estructura de la cromatina y de activar la expresión génica, hacen que esta proteína sea un regular único de la transcripción génica.





## **2.- ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE PARP-1.**

Desde el descubrimiento de la reacción de poli (ADP-ribosilación) y de PARP-1, hace ya más de 40 años (Chambon et al, 1963), el desarrollo de dos estrategias claves, han permitido elucidar el papel fisiológico de la proteína PARP-1. Estas estrategias han sido la obtención de ratones deficientes en PARP-1 y el desarrollo de potentes y selectivos inhibidores farmacológicos de la actividad enzimática de PARP-1. Gracias a estos hechos se ha podido constatar la implicación de PARP-1 en los procesos de reparación del ADN, de señalización celular, de transcripción génica, en la muerte celular y en el desarrollo de procesos tisulares causantes de la inflamación (Banasik et al. 1992; Shall and de Murcia 2000; Virag 2005).

### **2.1.- DESARROLLO DE RATONES DEFICIENTES EN PARP-1.**

Generados mediante eliminación genética por recombinación homóloga de diferentes exones presentes en el gen de PARP-1, se han obtenido tres líneas de ratones *parp-1*<sup>-/-</sup> por diferentes laboratorios en años sucesivos. La primera generación de ratones modificados genéticamente a través de la delección genética del exón 2 de PARP-1 fue obtenida por Wang y colaboradores en 1995. Menissier de Murcia y colaboradores, en 1997, lograron la interrupción genética del exón 4, y para el exón 1 se obtuvo en el año 1999 por Masutani y colaboradores. Estos ratones, a pesar de presentar diferencias en los puntos de delección del gen *parp-1*, presentan características fenotípicas similares y deficiencias en la reparación de daños en el ADN y alta inestabilidad genómica frente a estímulos genotóxicos (Simbulan-Rosenthal et al, 1999; Trucco et al, 1998; Conde et al, 2001), parada de ciclo en G2/M y retraso en el crecimiento (Trucco et al. 1998; Conde C. et al. 2001), y resistencia a ciertas patologías como: diabetes inducida por estreptomicina (Burkart et al. 1999; Masutani et al. 1999; Pieper et al. 1999), artritis inducida por peroxinitrito (Szabo et al. 1998), Parkinson inducido por MPTP (Mandir et al. 1999), isquemia cerebral (Eliasson et al. 1997) y choque séptico inducido por LPS (Kuhnle et al. 1999; Oliver et al. 1999). También se han establecido otras características

relacionadas con la ausencia de PARP-1 como son la desregulación en el proceso de control celular de la longitud de los telómeros (d'Adda di Fagagna et al. 1999).

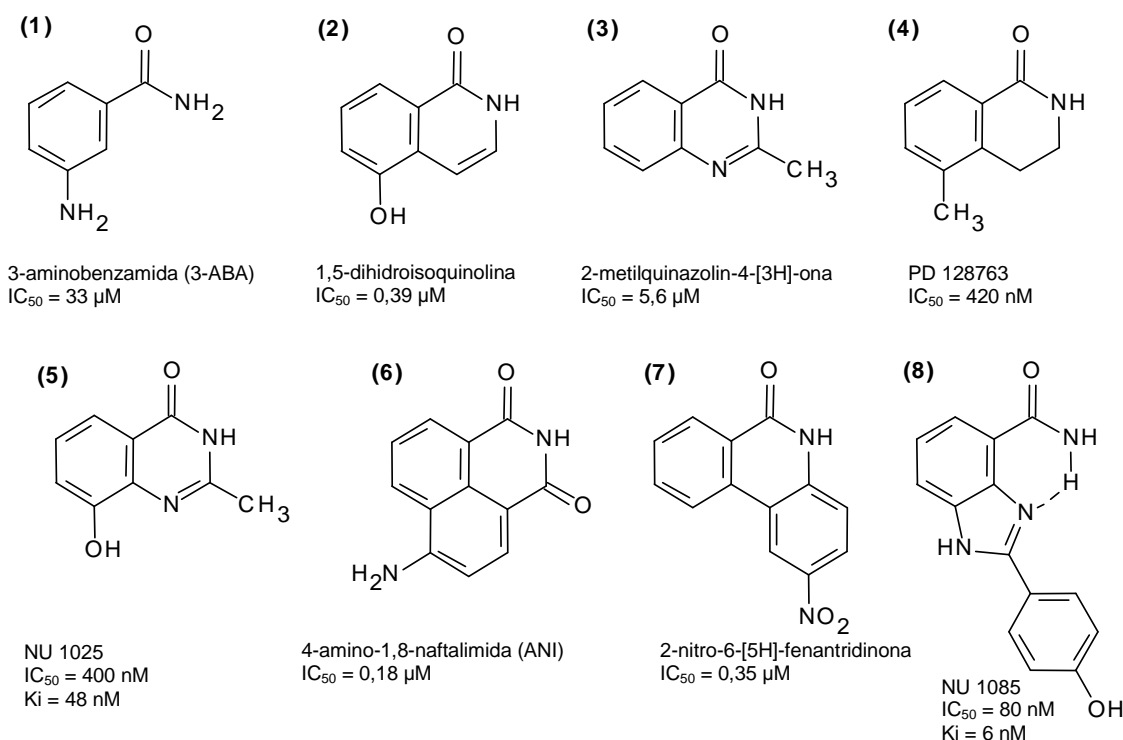
El estudio de las funciones fisiológicas de PARP-1 a nivel celular se ha podido realizar gracias a las líneas celulares inmortalizadas obtenidas a partir de estos ratones. Sin embargo, la información obtenida a partir del estudio de estos ratones proporciona una visión parcial del papel biológico de PARP-1, ya que en estas condiciones no se puede distinguir si su función principal en estos procesos se debe a interacciones físicas con otras proteínas o a su actividad enzimática de poli (ADP-ribosilación). Por este motivo, estos estudios se han completado mediante el uso de inhibidores químicos de la actividad enzimática de PARP.

## **2.2.- DESARROLLO DE INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE PARP.**

En la actualidad existen tres generaciones de inhibidores de PARP-1, los de primera generación o inhibidores clásicos, los de segunda y los de tercera generación. Los *inhibidores clásicos o de primera generación* basan su mecanismo de acción en la unión al dominio catalítico de PARP-1 ejerciendo una inhibición competitiva mediante la ocupación transitoria del centro de unión para  $\text{NAD}^+$ , por lo que son en su mayoría compuestos con estructuras análogas a dicho sustrato. En este grupo destacan las nicotinamidas ( $\text{IC}_{50} = 210 \mu\text{M}$ ), originadas por el catabolismo del  $\text{NAD}^+$  por PARP-1, actuando como inhibidores endógenos de PARP-1 produciendo una regulación negativa por retroalimentación. La débil actividad inhibitoria que presentan las nicotinamidas se ve incrementada mediante la incorporación de otros grupos químicos. De hecho, la mayoría de los inhibidores químicos de PARP-1 presentan en su a la nicotinamida (Purnell and Whish 1980). De los inhibidores de primera generación, los más utilizados son la benzamida ( $\text{IC}_{50} = 22 \mu\text{M}$ ) y la 3-aminobenzamida (3-ABA,  $\text{IC}_{50} = 33 \mu\text{M}$ ) [Figura 9, compuesto 1]. Los resultados obtenidos con el uso de los inhibidores clásicos muestran efectos importantes en la sensibilización de células tumorales a la radiación ionizante y agentes alquilantes como resultado de una deficiente reparación del daño inducido por estos agentes en el ADN. Sin embargo, la interpretación de los datos obtenidos es complicada debido a que son compuestos poco potentes y se necesitan concentraciones elevadas (3-10 mM) para producir quimio- y radiosensibilización. Estas

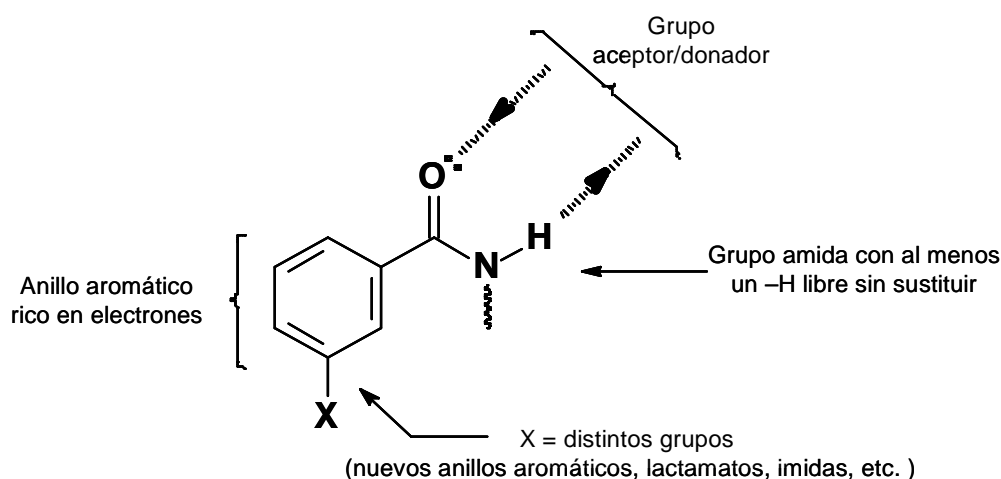
altas concentraciones de inhibidor han mostrado una elevada falta de especificidad ya que se ha observado que obstaculizan la biosíntesis de purinas, que son capaces de actuar como antioxidantes y de interferir en el metabolismo glucídico y en la viabilidad celular (Milam and Cleaver 1984; Virag and Szabo 2002). Asimismo, el uso de estos inhibidores potencia la muerte celular inducida por agentes no genotóxicos (como el cisplatino), mostrando su baja especificidad hacia PARP-1.

Los *inhibidores de segunda generación*, más potentes y específicos gracias al mayor conocimiento adquirido sobre la estructura del centro catalítico de PARP-1, fueron desarrollados en la época de los años 90. La mayor contribución a la evolución de los inhibidores de PARP fue realizada por Banasik (Banasik et al. 1992). La realización de un estudio de 170 fármacos como potenciales drogas inhibitorias de PARP-1, permitió identificar una gran variedad de compuestos con potente actividad inhibitoria, entre los cuales destacan: 1,5-dihidroxi-isoquinolina, 2-metilquinazolin-4-[3H]-ona, 4-amino-1,8-naftalimida y 2-nitro-6-[5H]-fenantridinona [Figura 9, compuestos 2, 3, 6 y 7]. Estos compuestos presentan una alta selectividad y potencia como inhibidores de PARP-1 ( $IC_{50} < 1\mu M$ ).



**Figura 9: Estructura de los inhibidores de PARP.**

Los numerosos estudios realizados han permitido mejorar el conocimiento de las características moleculares necesarias que debe de presentar un potente inhibidor que eficazmente bloquee la actividad enzimática de PARP-1 [Figura 10]. Estas características son las siguientes: presentar un anillo aromático o un sistema heterocíclico poliaromático rico en electrones que presente un enlace en la posición 3 de la benzamida y un grupo amida (-CONH<sub>2</sub>) con al menos un protón sin sustituir en orientación anti con respecto al enlace 1→2 del anillo aromático.

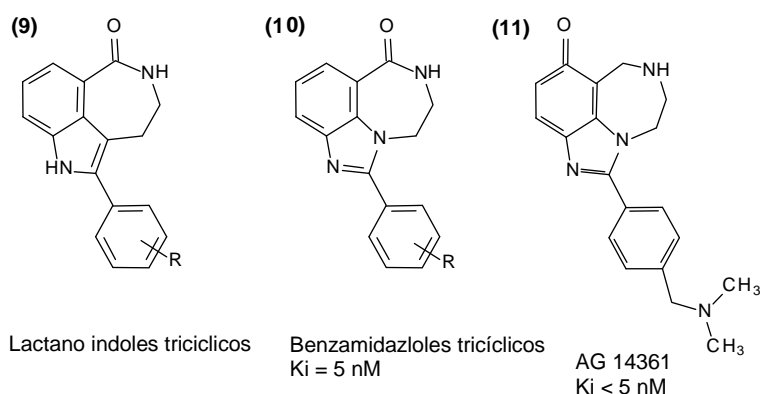


**Figura 10: Características estructurales requeridas de un potente inhibidor de PARP-1.**

Los trabajos con los inhibidores de segunda generación de PARP-1 a concentraciones de 50-100  $\mu$ M han mostrado efectos de sensibilización de la potenciación de la radiación ionizante y de agentes monoalquilantes mayores que los observados con los inhibidores de primera generación a concentraciones de 1-5 mM (3-ABA). Además, se han podido resolver las discrepancias resultantes de los estudios con las benzamidas y el empleo de cis-platino. Se ha demostrado que estos inhibidores más selectivos no potencian los efectos citotóxicos producidos por agentes que no producen daños en el ADN como el cis-platino.

La resolución de la estructura cristalina del dominio catalítico de PARP-1 (Ruf et al. 1996) ha constituido un hecho importante para el perfeccionamiento de los inhibidores de PARP-1. La cristalización de los inhibidores PD128763, 4-amino-1,8-naftalimida y NU1025 en el sitio de unión del NAD<sup>+</sup> en el dominio catalítico de la proteína PARP-1, ha revelado la importancia de los enlaces de hidrógeno realizados entre el grupo amida del inhibidor y la ser904 y la gly863 de la proteína. Estos enlaces

son más fuertes y por tanto mayor la potencia y selectividad del inhibidor, con la presencia del grupo amida del inhibidor anclado con una conformación fija a través de su inserción en un anillo heteroaromático. Los *inhibidores de tercera generación* se han desarrollado basándose en estos estudios cristalográficos, como los compuestos tricíclicos derivados de lactano-indoles y los benzamidazoles (Canan Koch et al. 2002; Calabrese et al. 2004). Estos compuestos presentan una alta selectividad y son extremadamente potentes con IC<sub>50</sub> del rango de nanomolar [Figura 11]. Uno de estos compuestos, el AG14361, está siendo objeto de estudio en ensayos clínicos desde junio de 2003 en combinación con el agente alquilante temozolomida (TMZ) (<http://science.cancerresearchuk.org/fandm/drugdevelopment/curearlycts/>).




---

**Figura 11: Estructura molecular de los nuevos inhibidores de PARP-1.**

---

En resumen, gracias al uso de los inhibidores de PARP-1 se ha podido demostrar que la actividad catalítica del enzima está directamente implicada en los procesos de reparación del daño del ADN y que su inhibición incrementa la sensibilidad de células tumorales frente a agentes alquilantes como la TMZ, inhibidores de la topoisomerasa I como el irinotecan, inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina (Muñoz-Gómez JA et al, 2005) o radiación ionizante, y además no produce ningún efecto en la terapias antitumorales que no basan su acción en la inducción de daños en el ADN como el cis-platino, demostrando su alta especificidad.



### **3.- CARCINOMA HEPATOCELULAR.**

El carcinoma hepatocelular (CHC) es uno de los tumores malignos más frecuentes en todo el mundo responsable del 80% de los tumores de hígado en adultos (Avila et al, 2006). Actualmente constituye el sexto cáncer más frecuente en el hombre y el undécimo en la mujer, y a nivel mundial representa la tercera causa de muerte por neoplasia, en el hombre, y la séptima en la mujer (Hussain et al, 2001), causando más de 600.000 muertes anuales (Bosh et al, 2004). Su incidencia varía según el área geográfica, concentrándose la mayor parte en los países asiáticos y algunos africanos, aunque en las últimas épocas su aparición ha aumentado dramáticamente en Estados Unidos y Europa. Este aumento en la incidencia del CHC se atribuye a la exposición masiva al virus de la hepatitis C (VHC), que ha provocado un incremento de enfermos con hepatopatía crónica por virus C, así como un mayor consumo de alcohol en ciertas zonas geográficas.

En la mayoría de los casos, el CHC aparece sobre una cirrosis hepática, entre el 80-90% de los casos (Ramírez Plaza et al, 2000), constituyendo actualmente la principal causa de muerte en estos pacientes (Sangiovanni et al, 2006). El CHC a menudo se diagnostica en estados avanzados de la enfermedad donde las terapias curativas, como la resección, trasplante e intervenciones percutáneas y transarteriales presentan una eficacia reducida constituyendo el CHC ser una de las neoplasias con menor tasa de curación. Además, el CHC es resistente a la quimioterapia convencional, y rara vez susceptible a la radioterapia, por tanto esta enfermedad carece de opciones terapéuticas eficaces, siendo de extrema necesidad el desarrollo de nuevas estrategias para poder combatir esta enfermedad.

#### **3.1.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ETIOLOGÍA DEL CHC.**

La incidencia del CHC varía enormemente según las áreas geográficas debido a los diferentes factores etiológicos atribuibles a dichas áreas. De este modo se pueden establecer tres zonas o áreas diferentes:

-De **alta** incidencia: corresponde a las zonas de Extremo Oriente y del África Subsahariana, representando un 30-50% de todas las neoplasias.



-De **media** incidencia: corresponde a los países europeos del área mediterránea, Suiza y Polonia, cuya incidencia es de 6 casos por 100000 habitantes y año.

-De **baja** incidencia: corresponde a EE.UU, Australia, Canadá y Norte de Europa, donde la incidencia es de 3 casos por 100000 habitantes y año.

La principal razón de la elevada incidencia de CHC en las zonas de Asia y África es la frecuencia de la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) (la infección crónica por VHB es endémica en estas regiones), mientras que en nuestro medio el 80% de CHC se relacionan con el VHC y sólo un 9% con el virus de la hepatitis B (VHB), siendo los principales factores de riesgo de CHC en todo el mundo (Del Val Antoñana et al, 2002). En ambos casos, a menudo ocasionan cirrosis, que en sí misma es un importante factor de riesgo, ya que entre el 80- 90% de los CHC se desarrollan sobre una cirrosis. En los últimos años la exposición masiva al VHC ha hecho que sea considerado el primer agente etiológico de enfermedad hepática. El mecanismo por el cual el VHC contribuye al desarrollo de CHC se debe al proceso inflamatorio crónico con el que cursa la enfermedad. Los fenómenos de necrosis, inflamación crónica y regeneración hepática que tienen lugar por la respuesta inmune frente a la infección, y tras varios años, dan como resultado ciclos de muerte y regeneración, llegando a originar cirrosis y posteriormente CHC [Figura 12].

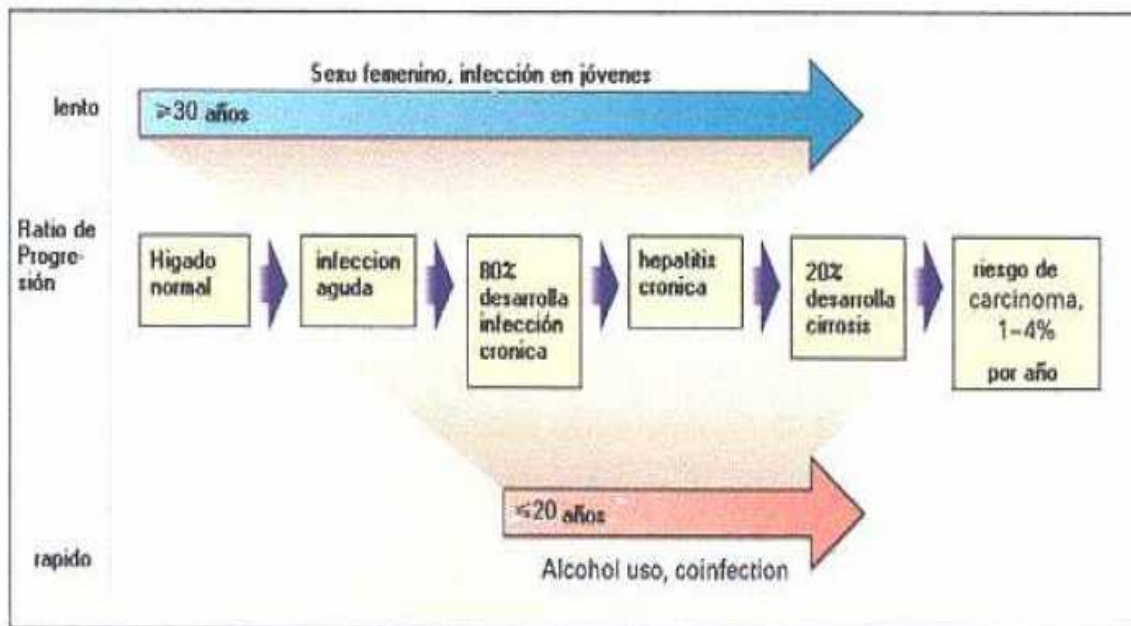


Figura 12: Curso de la infección por VHC (Georg et al, 2001).

En la infección crónica por el VHB, además del daño crónico hepático que se produce cuando la infección se cronifica, es capaz de integrarse en el ADN del genoma del huésped, ya que un virus ADN. Aunque no está claro su poder oncogénico, numerosos estudios han puesto de manifiesto que su proteína del gen X, la proteína HBx, tiene una importante función tanto en el establecimiento del CHC como en los estadios posteriores que dan lugar a la metástasis [Figura 13]. La función mejor caracterizada de la proteína HBx es su capacidad transactivadora, a través de la cual induce transcripcionalmente a diferentes genes celulares implicados en la respuesta inflamatoria y la carcinogénesis (Yoo et al, 1996). También se ha demostrado que es capaz de interactuar con la mitocondria generando un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a la activación de factores de transcripción como el NF-kB (Waris , 2001).

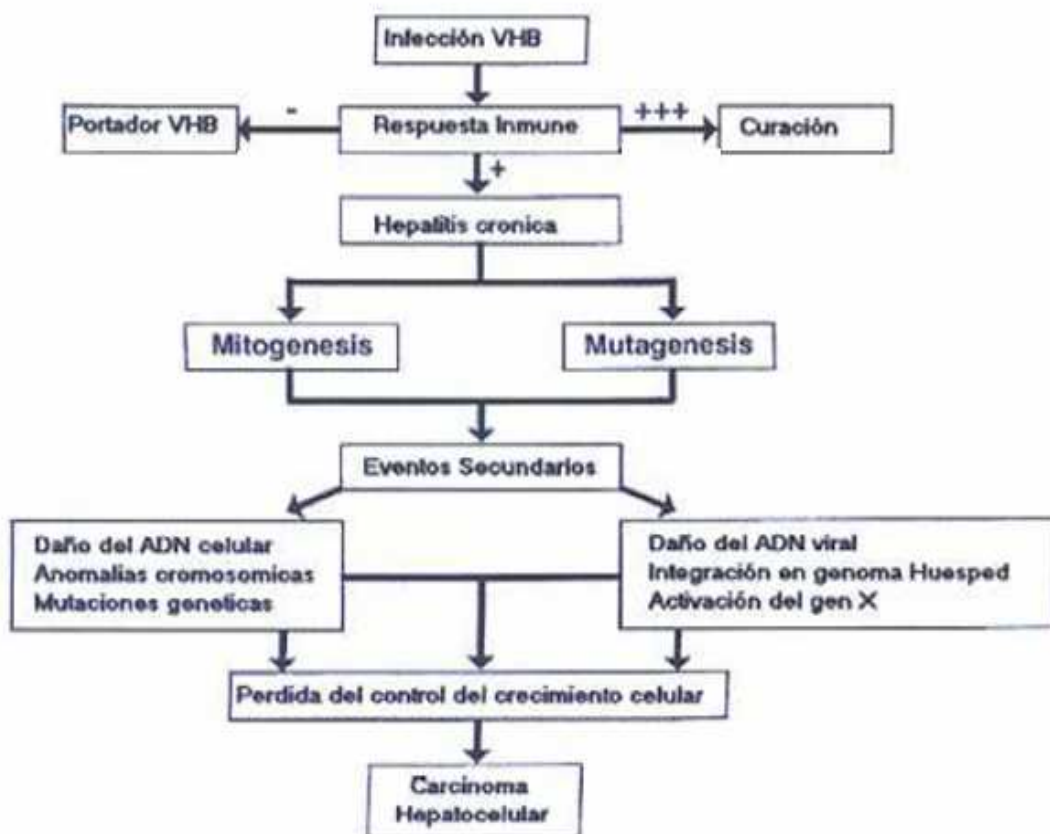


Figura 13: Mecanismos hepatocarcinogénicos del VHB (Chisari, 2000).

Además de estos factores virales, cualquier agente o factor que contribuya a la lesión crónica y a la mitosis determina que el ADN de los hepatocitos sea más vulnerable a las alteraciones genéticas. El resto de factores etiológicos de CHC causantes de hepatopatía crónica son el alcohol, factores hormonales, como anticonceptivos orales, enfermedades genéticas, como el déficit de antitripsina, hemocromatosis y/o tiroseemia etc... Otro factor de riesgo típico de las zonas Asiáticas y del África Subsahariana, lo representa la aflatoxina B1. Esta es una micotoxina producida por dos hongos del género *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) que contaminan cereales almacenados en condiciones de alta temperatura y humedad. Cuando es ingerida y metabolizada por el hombre, produce un epóxido que se fijaría a las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos e induciría una mutación muy específica en el codón 249 del gen supresor de tumores p53, cuya pérdida, inactivación o mutación se ha involucrado en la génesis de tumores y constituye la alteración genética más frecuente presente en los cánceres humanos. En el caso concreto del CHC, la alteración de p53 se ha reconocido en CHC avanzados y no en estadios precoces y no siendo un requisito para la transformación maligna (Teramoto et al, 1994). El p53 mutado, aparece en un alto porcentaje de las neoplasias hepáticas desarrolladas en las áreas donde la contaminación por aflatoxina es elevada, no hallándose en CHC de áreas de baja exposición (Hsu et al, 1991). También se han observado una relación entre p53 y CHC desarrollados en pacientes con infección crónica de VHB. Dependiendo de la cantidad de p53 en la célula, la proteína HBx inhibiría la división celular, en presencia de gran cantidad de p53, o favorecería la progresión del ciclo celular si la expresión de p53 es muy baja o nula (Ahn et al, 2002).

### ***3.2.- DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE DEL CHC.***

Frecuentemente, el CHC se desarrolla sobre una cirrosis hepática, independientemente de su origen etiológico. Por este motivo, los pacientes cirróticos deben de ser sometidos a un protocolo de seguimiento o screening consistente en la realización de ecografías abdominales (Bruix et al, 2001; Bruix et al, 2005). El objetivo de estos protocolos de seguimiento es poder diagnosticar el CHC en un estadio inicial con el fin de poder aplicar tratamientos curativos. Dado que el CHC

suele aparecer sobre un hígado cirrótico, las manifestaciones clínicas con las que cursa la enfermedad, no son otras que las debidas a la cirrosis hepática de base, ya que el CHC es un tumor que no manifiesta síntomas hasta que no existe una gran propagación y diseminación. Cuanto más avanzada se encuentre la enfermedad en el momento del diagnóstico y a medida que esta progresa, el cuadro clínico presentará mayor descompensación de la hepatopatía (ascitis, ictericia, encefalopatía), hemorragia digestiva, dolor abdominal y síndrome constitucional. De este modo, dependiendo del momento evolutivo de la enfermedad en que se efectúe el diagnóstico, los pacientes con buena reserva funcional hepática en los que el CHC es asintomático, podrán sobrevivir varios años, incluso sin tratamiento, mientras que, en pacientes en fase terminal de su hepatopatía o en fases muy avanzadas de la progresión tumoral, su esperanza de vida se reducirá a semanas.

Los criterios diagnósticos utilizados actualmente son la cuantificación de la fetoproteína alfa (AFP), un antígeno oncofetal producido por 50-90% de los CHC pero no por los hepatocitos normales, y cuya concentración se eleva en el 60-70% de los pacientes con CHC; diagnósticos radiológicos como el ultrasonido abdominal, tomografía computarizada o MRI y la biopsia hepática que proporcionará una indicación clara cuando existe duda en el diagnóstico.

Gracias al desarrollo de las técnicas de imagen y a los programas de seguimiento de los pacientes cirróticos, el CHC es diagnosticado cada vez de un modo más precoz, contribuyendo al aumento de las opciones terapéuticas. El tratamiento correcto de esta enfermedad estará condicionado por la presencia de una hepatopatía crónica o una cirrosis y su grado de evolución, clasificándose los pacientes según los estadios de Child-Pugh (Tabla 1); y por la estadificación preoperatoria del CHC. Dependiendo del estadio de Child y de la estadificación del tumor, los pacientes pasaran a una o a otra modalidad terapéutica (Perez et al, 2000). A través de la clasificación de Child-Pugh se puede conocer la reserva funcional hepática del paciente, hecho fundamental para decidir la mejor opción terapéutica. Para el estadiaje tumoral, la clasificación propuesta por Okuda et al en 1985 (Tabla 2) es la más utilizada debido a su simplicidad y porque toma en cuenta parámetros funcionales fácilmente disponibles (ascitis, albúmina y bilirrubina) y el tamaño tumoral. Con el descubrimiento de nuevos fármacos pronósticos y la información obtenida por las técnicas de imagen y, lo más importante, por programas de screening ecográfico que permitieron el diagnóstico temprano del CHC, se hizo

necesaria una estadificación más detallada. De esta forma, apareció en 1987 la primera clasificación TNM (Tumor, Nódulo, Metástasis) del CHC de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) (Tabla 3).

**Tabla 1: Clasificación de Child-Turchotte-Pugh.**

Puntos	1	2	3
<b>Encefalopatía</b>	No	1 ó 2	3 ó 4
<b>Ascitis</b>	No controlada por diuréticos	Moderada o con diuréticos	Masiva-no controlada
<b>Bilirrubina (mg/dl)</b>	1-2	2-3	>3
<b>En pacientes con CBP o CEP</b>	<4	4-10	>10
<b>Albúmina</b>	>3,5	2,8-3,4	<2,8
<b>Prolongación del tiempo de protrombina (segundos) o "Índice de Quick"</b>	1-4	4-6	>6
	>70%	40%-70%	<40%
<b>Graduación (total de puntos): A 1-6; B 7-9; C 10-15</b>			

**Tabla 2: Clasificación de Okuda et al 1985.**

Estadío	Tamaño tumoral		Ascitis		Albúmina		Bilirrubina	
	>50% (+)	<50% (-)	(+)	(-)	<3g/dl (+)	>3g/dl (-)	>3mg/dl (+)	<3mg/dl (-)
I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
II					1 ó 2 (+)			
III					3 ó 4 (+)			

+: Signo de enfermedad avanzada

**Tabla 3: Clasificación TNM del CHC según la UICC**

<b>Estadío I</b>	T1	N0	M0
<b>Estadío II</b>	T2	N0	M0
<b>Estadío III</b>	T3	N0	M0
	T1-3	N0	M0
<b>Estadío IV A</b>	T4	N0-1	M0
<b>Estadío IV B</b>	T1-4	N0-1	M1

---

**Tabla 3: Clasificación TNM del CHC según la UICC: T1:** tumor solitario,  $\leq 2$  cm, sin invasión vascular; **T2:** tumor solitario,  $\leq 2$  cm, con invasión vascular; tumores múltiples, unilobulares,  $\leq 2$  cm, sin invasión vascular; tumor sólido,  $>2$ cm, sin invasión vascular; **T3:** tumor solitario,  $>2$ cm, con invasión vascular; tumores múltiples, unilobulares, alguno  $>2$ cm, con o sin invasión vascular; **T4:** tumores múltiples, bilobulares o invasión bilobular; invasión de rama portal mayor o venas suprahepáticas; **N1:** afectación de ganglios linfáticos regionales; **M1:** metástasis a distancia, incluyendo metástasis en ganglios linfáticos remotos.

---

Otro de los sistemas de estadiaje propuesto en los últimos años es el sistema BCLC o Barcelona Clinic Liver Cancer (Loret et al, 1999). Este sistema tiene en cuenta, entre otros parámetros, la función hepática (clasificación de Child-Pug), extensión tumoral y el estado general, considerando cuatro grandes grupos:

- **Estadio A o inicial:** pacientes con función hepática conservada y tumores limitados (nódulo único  $<5$  cm o un máximo de 3 nódulos hasta 3 cm), candidatos a tratamiento curativo. La supervivencia de este grupo puede llegar al 70% a los 5 años. Además, aquellos pacientes con tumor único menor de 2 cm, con excelente función hepática y sin presentar hipertensión portal, se les considera como estadio 0 ó muy inicial y con buen pronóstico.
- **Estadio B o intermedio:** pacientes con tumores multinodulares mayores de 3 cm, sin invasión vascular ni extrahepática. La mejor opción terapéutica para este grupo es la quimioembolización y la supervivencia media esperada es de 20 meses.
- **Estadio C o avanzado:** pacientes con función hepática conservada y un CHC con invasión vascular y/o extrahepática. La supervivencia media para estos pacientes es de 6 meses, sin tratamiento. En la actualidad, los resultados positivos obtenidos en un ensayo clínico fase 3 con un inhibidor multiquinasa, el sorafenib, son la única opción de tratamiento con beneficios respecto a supervivencia para este grupo de pacientes.
- **Estadio D o terminal:** pacientes con neoplasias de gran tamaño, estadio C de Child-Pug, no candidatos a trasplante y cuya supervivencia suele ser menor de 3 meses.

### **3.3.- TRATAMIENTO DEL CHC.**

La elección del tratamiento óptimo para los pacientes de CHC debe de estar siempre basada en el estadiaje tumoral en el momento del diagnóstico y en el grado de deterioro de la función hepática, determinada habitualmente mediante la clasificación de Child. Aproximadamente, entre el 15-20% de los pacientes serán candidatos a opciones terapéuticas curativas, mientras que el resto de los casos se valorará la indicación de terapias paliativas. Las diferentes alternativas terapéuticas para los pacientes de CHC se detallan a continuación:

#### **1.- Opciones de tratamiento curativo:**

- **Resección quirúrgica:** el tratamiento quirúrgico es la opción de tratamiento más eficaz y la única que ofrece posibilidad de curación. Los pacientes candidatos serán aquellos con cirrosis hepática compensada estadio A de Child e indicada a tumores únicos menores de 5 cm sin evidencia de invasión vascular ni diseminación extrahepática. Aproximadamente un 10 a 20% de los pacientes presentan tumores potencialmente resecables. Los inconvenientes que presenta esta resección son una la alta mortalidad operatoria en pacientes con cirrosis hepáticas, aproximadamente un 10%, aparición de descompensación (principalmente ascitis) tras la resección y una tasa del 50% presentan recurrencia a los cinco años (Del Val Antoñana et al, 2002).
- **Trasplante hepático:** esta opción es la única terapia curativa tanto del CHC como de la cirrosis. El gran problema existente para que pueda ser utilizado a nivel mundial es la limitación que supone depender de la obtención de órganos, además del económico. Esta opción terapéutica está indicada para pacientes menores de 65 años, con tumores únicos inferiores a 5 cm de diámetro en estadio B o C de Child, en aquellos en estadio A con hipertensión portal o cuando se detectan hasta tres nódulos de un máximo de 3 cm cada uno en un mismo lóbulo sin evidencia de invasión vascular ni diseminación extrahepática en los que la resección

está contraindicada por deterioro de la función hepática o imposibilidad técnica. En estos casos la supervivencia a los cinco años puede alcanzar el 70%.

- **Inyección percutánea de etanol:** esta terapia está ampliamente aceptada y consiste en la inyección percutánea de alcohol etílico el cual induce necrosis coagulativa y trombosis vascular transformando el nódulo tumoral en un área necrótica avascular. La eficacia de ésta terapia es alta aunque está relacionada directamente con el tamaño del CHC (Ishii et al, 1996), siendo los candidatos idóneos aquellos con CHC únicos con un diámetro inferior o igual a 3 cm.
- **Radiofrecuencia:** esta técnica consiste en la aplicación de una aguja-electrodo en el tejido tumoral conectada a un generador de radiofrecuencia. La energía emitida intenta alcanzar su campo eléctrico, se produce agitación iónica y la energía se transforma en calor hasta alcanzar temperaturas mayores de 50°C induciendo una necrosis coagulativa. Los candidatos a esta terapia serán aquellos con CHC menor de 3 cm de diámetro, rodeados de parénquima hepático normal, situados a más de 1 cm de la cápsula de Glisson y a más de 2 cm de las venas hepáticas o portales. Puede aplicarse tanto a los CHC como a las metástasis.

## 2.- Opciones de tratamiento paliativo:

- **Quimioembolización:** terapia aplicable a tumores de entre 3 y 7 cm, ampliamente utilizado en el CHC basado en la vascularización absolutamente arterial de esta neoplasia. Consiste, por vía transarterial se cateteriza la rama derecha o izquierda de la arteria hepática, se administran quimioterapéuticos, habitualmente doxorubicina combinados con lipiodol, este medio de contraste será captado selectivamente por el tejido tumoral pero no por el parénquima hepático sano y a continuación se realiza la oclusión segmentaria de la arteria que irriga el tumor. A pesar de la habitual utilización de esta técnica, no existen evidencias de beneficio clínico, especialmente en cuanto a una mejoría de la supervivencia.



- **Nuevos fármacos:** debido a que sólo una cuarta parte de los pacientes que desarrollan CHC pueden beneficiarse de las opciones terapéuticas anteriores, la investigación de nuevas terapias aplicables a estos tumores es un tema de primer orden. Entre los nuevos fármacos utilizados se encuentran:

- **Tamoxifeno:** fármaco antiestrogénico utilizado en el tratamiento del CHC por la presencia de receptores estrogénicos en los hepatocitos normales y tumorales. En un estudio realizado con pacientes de CHC tratados con tamoxifeno aunque no se consiguió una reducción del tamaño tumoral sí se observó una reducción de la alfa-fetoproteína y estabilización del tamaño del CHC sugiriendo un probable efecto sobre el crecimiento tumoral (Farinati et al, 1992).

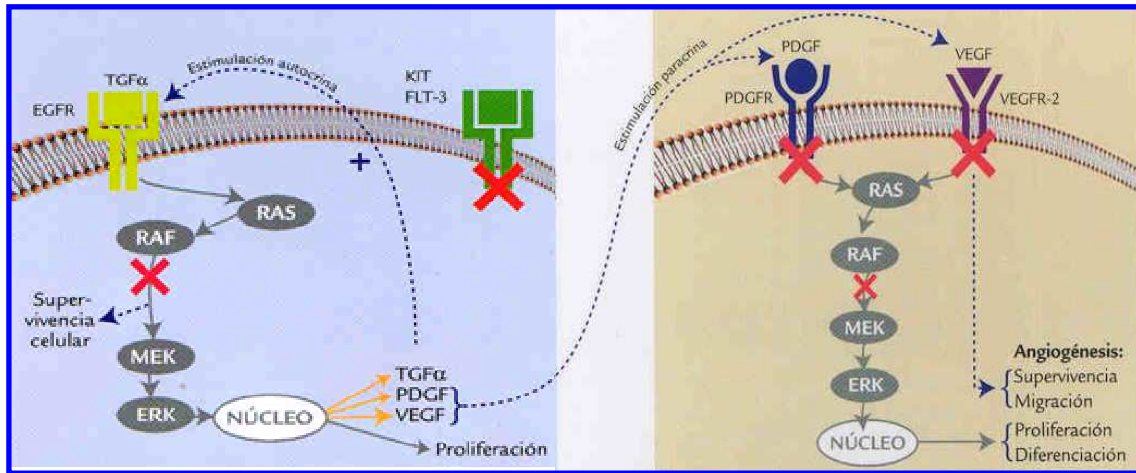
- **Interferon:** el interferon tiene propiedades biológicas como inhibición de la angiogénesis y actividad inmunomoduladora y antiproliferativa. Debido a esa actividad antitumoral ha sido utilizado para el tratamiento de neoplasias hematológicas. Numerosos estudios han demostrado una disminución de la incidencia de CHC en pacientes con hepatitis C crónica tratados con interferón (Nishiguchi et al, 1995). En contraste, otros estudios no obtuvieron ningún beneficio sobre la supervivencia ni sobre la progresión tumoral.

- **Terapia génica:** en la actualidad se encuentra en fase experimental (Sangro et al, 2000).

- **Quimioterapia:** la administración por vía sistémica o intraarterial ha logrado conseguir en ocasiones respuestas parciales, con reducción de la masa tumoral, pero no se ha demostrado una mejoría en la supervivencia, además de estar relacionada con una toxicidad significativa. Uno de los quimioterapéuticos usados actualmente en la quimioterapia frente al CHC es la doxorubicina. Esta es un antibiótico antracíclico capaz de producir daños en el ADN e inhibir la topoisomerasa II induciendo muerte celular por apoptosis. El gran problema que presenta esta antraciclina es el desarrollo de resistencia tumoral, además de unas cifras de toxicidad inaceptables. Recientemente, se han publicado los resultados obtenidos en un ensayo clínico en fase II donde se utilizan esferas cargadas de

doxorubicina, que al contacto con la sangre, se libera lentamente, reduciendo el paso del quimioterapéutico en la circulación sistémica y minimizando los efectos secundarios (Valera et al, 2007).

- **Sorafenib**: inhibidor multiquinasas aprobado para el tratamiento del CHC. Este inhibidor de quinasas actúa a dos niveles, bloqueando una de las rutas de señalización implicadas en la hepatocarcinogénesis, la vía RAF/MEK/ERK, e inhibiendo la angiogénesis a través de la inhibición de los receptores tirosina quinasa del factor de crecimiento endotelial vacular o VEGFR y del factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGFR. Tras los resultados preclínicos obtenidos y en un ensayo fase II (Abou-Alfa et al, 2006), se procedió a un ensayo clínico fase III internacional, multicéntrico, doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo en un total de 602 pacientes (Llovet et al, 2007) (ensayo SHARP: Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol Trial). Los resultados obtenidos mostraron beneficios en términos de supervivencia (aumento de la supervivencia global en un 44%), retraso en la progresión tumoral y una baja tasa de efectos secundarios. Para los pacientes en estado de CHC avanzado, este tipo de tratamiento es la mejor opción [Figura 14].



**Figura 14: Mecanismo de actuación de Nexavar® (Sorafenib).** El sorafenib es el único inhibidor multiquinasa aprobado en octubre del año 2007 para el tratamiento del CHC. La inhibición multiquinasa de Sorafenib (señaladas como X) reduce la proliferación de las células tumorales a través de la inhibición de los receptores KIT y FLT-3 y de la vía de señalización RAF/MEK/ERK. Además reduce la angiogénesis por la inhibición de los receptores tirosina quinasa VEGFR y PDGFR.

### 3.4.- HEPATOCARCINOGENÉISIS.

La carcinogénesis se puede definir como el resultado de un proceso en varias etapas durante las cuales ocurren numerosas alteraciones genéticas. En resumen, este proceso multifásico puede dividirse en tres etapas:

- **Etapa de iniciación tumoral:** Numerosos agentes físicos (radiaciones ionizantes y U.V), químicos (aflatoxinas, nitrosaminas etc.) o virales (VHC, VHB etc.) producen mutaciones en el ADN originando células transformadas. Estas células son genéticamente inestables por lo que van acumulando mutaciones que las hacen independientes a los factores de

crecimiento externos, resistentes a los inhibidores de proliferación celular e inhibición de los mecanismos de muerte celular.

- ***Etapas de progresión tumoral:*** La proliferación incontrolada de esas células transformadas originan la lesión preneoplásica. La acumulación de nuevas mutaciones dará lugar a la aparición del tumor.
- ***Etapas de invasión y metástasis:*** Finalmente las células adquieren capacidad para escapar del tumor primario e invadir nuevos tejidos y órganos originando tumores secundarios.

Por tanto, la hepatocarcinogénesis es el resultado de un proceso multifásico, desarrollándose lentamente en un trasfondo de enfermedad hepática crónica, incluyendo la hepatitis crónica y la cirrosis, las cuales pueden ser consideradas estados preneoplásicos (Coleman, 2003; Bréchet, 2004; Liang and Sèller, 2004). En la actualidad, las alteraciones moleculares más relevantes que ocurren en las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis, son desconocidas. En cambio, es bien conocido que la hepatitis crónica es el resultado de un proceso inflamatorio prolongado, con infiltrado de células inflamatorias en el parénquima hepático, provocando la muerte necrótica de los hepatocitos. En respuesta al daño producido por la inflamación crónica y la necrosis hepatocitaria, los hepatocitos viables proliferan para intentar restaurar ese daño hepático (Coleman, 2003), y además, el compartimento reserva de células progenitoras será activado (Sell, 2002). Este compartimento contiene las células progenitoras, también llamadas células ovales, que presentan una amplia capacidad de autorrenovación y pueden diferenciarse a un linaje hepatocítico o biliar (Libbrecht and Roskams, 2002).

La progresión de hepatitis crónica a cirrosis hepática se ve caracterizada por la alteración de la arquitectura hepática y, en algunos casos, por la aparición de hepatocitos fenotípicamente alterados, agrupados en nódulos regenerativos, siendo estos considerados como precursores de nódulos displásicos (Kojiro and Roskams, 2005). La presencia de estos hepatocitos displásicos en la cirrosis hepática representa un riesgo potencial de desarrollar CHC (Coleman, 2003), llegándose a considerar a estos hepatocitos alterados genómicamente como el origen celular del CHC.

Actualmente, también se está considerando como posible origen del CHC, a las células troncales del hígado o “stem cells”, cuyos marcadores se han encontrado en una alta proporción de CHC humanos (Libbrecht and Roskams, 2002). Estas células, denominadas como células madre cancerosas o “cancer stem cels”, procederían de

células troncales normales, con capacidad de autorrenovación, que adquieren cambios genéticos y epigenéticos que transforma su fenotipo, siendo las responsables de la progresión tumoral y la diseminación tumoral (Clarke 2005; Dean et al, 2005).

Considerando un origen celular u otro, en los últimos años se han podido identificar diferentes alteraciones genéticas y genómicas más relevantes implicadas en la hepatocarcinogénesis, gracias a la aplicación de las nuevas tecnologías de análisis genómico, lo que está permitiendo diseñar nuevas estrategias terapéuticas, como es el caso del inhibidor de quinasas sorafenib.

### **3.4.1.- ALTERACIONES GENÉTICAS Y GENÓMICAS DEL CHC.**

Las alteraciones genéticas observadas en el CHC pueden variar desde mutaciones puntuales hasta la pérdida o ganancia de brazos cromosómicos, siendo estas alteraciones diferentes entre distintos individuos e incluso entre los diferentes nódulos presentes en un mismo individuo. El estudio de las alteraciones cromosómicas en el CHC se realiza a través de la técnica de hibridación genómica comparativa o HGM, gracias a la cual, se ha determinado que la alteración cromosómica más habitual en el CHC afecta al cromosoma 1q. Las alteraciones que afectan a áreas menores, como el desequilibrio alélico o mutaciones puntuales, pueden ser determinadas mediante la tecnología SPN o “high-density single nucleotide polymorphism arrays (Affymetrix 500K<sup>®</sup>). De esta manera, se ha puesto de manifiesto que la pérdida de heterocigocidad o LOH es muy frecuente en el CHC, principalmente la pérdida de heterocigocidad en 1p, 4q, 6q, 8p, 9p, 16q y 17p (Koo et al, 2003). Respecto a las mutaciones puntuales más frecuentes en el CHC podemos destacar:

- **Gen supresor de tumores p53:** este gen está implicado en el control del ciclo celular, reparación del ADN, inducción de apoptosis y diferenciación. Numerosos estudios han revelado que la tasa de mutación de p53 en los CHC es muy elevada en las regiones geográficas de África y Asia, debido a la exposición a la aflatoxina (Tanaka et al, 1993), la cual es endémica de estas áreas. En cambio, un alto porcentaje de alteraciones genéticas de p53 son observadas en estados avanzados de CHC, esto sugiere que estas anomalías

genéticas de p53 están asociadas con los estados más avanzados de la enfermedad, considerándose en evento tardío de la hepatocarcinogénesis ( Kim et al, 2005).

- ***β-catenina***: la regulación anormal de la β-catenina ocurre como un evento temprano en la hepatocarcinogénesis. La β-catenina es un efector intracelular crucial en la ruta de señalización Wnt (vía de señalización desregulada en el CHC), y también participa en las interacciones célula-célula a través de su asociación con la E-cadherina (Giles et al, 2003; Harris and Peifer, 2005).

Por otro lado, la aplicación de las nuevas tecnologías de microarrays de ADN han permitido seleccionar un grupo de genes o gene signature, cuya expresión está desregulada en los pacientes de CHC, con el fin de ser utilizados con carácter diagnóstico y para evaluar la respuesta al tratamiento (tabla 4) (Lee et al, 2004).

Función	Gen	Expresión
Vías factores de crecimiento	<i>IGF-II</i>	Incrementada
	<i>IGFR-II (M6PR)</i>	Disminuida
	<i>EGF</i>	Incrementada
	<i>EGFR</i>	Incrementada
	<i>TGF-α</i>	Incrementada
	<i>HGF</i>	Incrementada
	<i>c-MET</i>	Incrementada
	<i>PTEN</i>	Disminuida
Proliferación y diferenciación	<i>TGF-βI</i>	Disminuida
	<i>β-catenina</i>	Incrementada
	<i>E-cadherina</i>	Disminuida
Angiogénesis	<i>c-myc</i>	Incrementada
	<i>VEGF</i>	Incrementada
	<i>VEGFR-2</i>	Incrementada
Metástasis	<i>Angiopoietina-2</i>	Incrementada
	<i>MMP-14</i>	Incrementada
	<i>MMP-9</i>	Incrementada
	<i>Topoisomerasa 2A</i>	Incrementada
Ciclo celular	<i>Osteopontina</i>	Incrementada
	<i>Rb</i>	Incrementada
	<i>Ciclina D1</i>	Disminuida
	<i>p53</i>	Disminuida
	<i>p16</i>	Disminuida
<i>p27kip</i>	Disminuida	
<i>Survivina</i>	Incrementada	

---

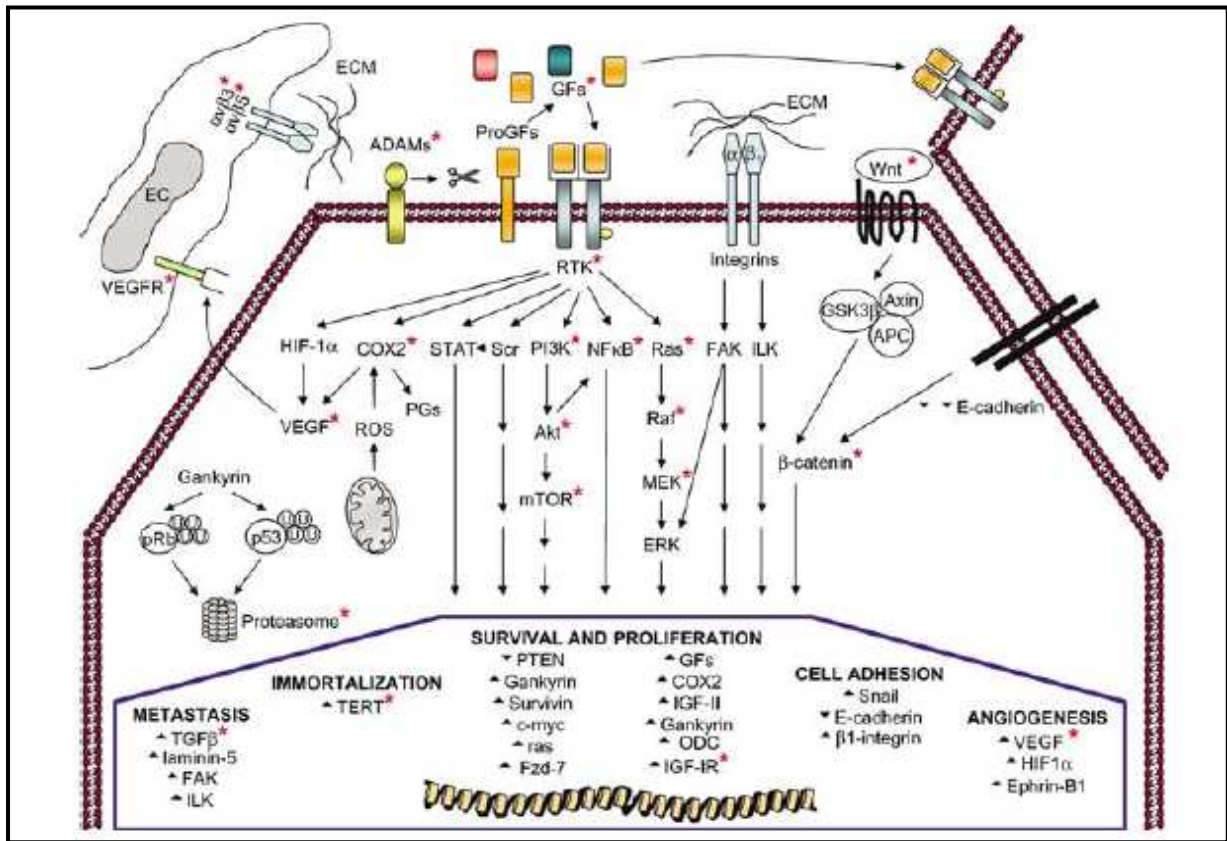
**Tabla 4: Variaciones de los valores de expresión de numerosos genes asociados con el CHC (Villanueva et al, 2007)**

---

Una de las alteraciones genómicas observadas durante el proceso de hepatocarcinogénesis es la hipermetilación de regiones promotoras frecuentemente de genes supresores de tumores como p16INK4 $\alpha$ , IGFRII/MP6, BRCA1 y E-cadherina. Otra característica de las enfermedades crónicas hepáticas es el acortamiento de los telómeros, lo que provoca inestabilidad cromosómica, fusiones entre extremos de cromosomas y muerte celular. La reactivación de la telomerasa reestablece la longitud de los telómeros e inmortaliza el fenotipo de las células. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que en el 90% de los CHC humanos se observa una reactivación de la actividad de la telomerasa, evento asociado a estadios avanzados (Farazo P et al, 2006). Además, el oncogen c-myc, sobre-expresado en los CHC humanos (Coleman, 2003), activaría el promotor del gen de la telomerasa, TERT.

#### ***3.4.2.- VIAS DE SEÑALIZACIÓN DEL CHC.***

El conocimiento de las vías de señalización implicadas en el CHC ha proporcionado un camino de investigación enfocado a la búsqueda de nuevas terapias moleculares frente a esta neoplasia. En la actualidad, las vías de señalización implicadas en el CHC se resumen en la figura 15 y se detallan a continuación las más relevantes:

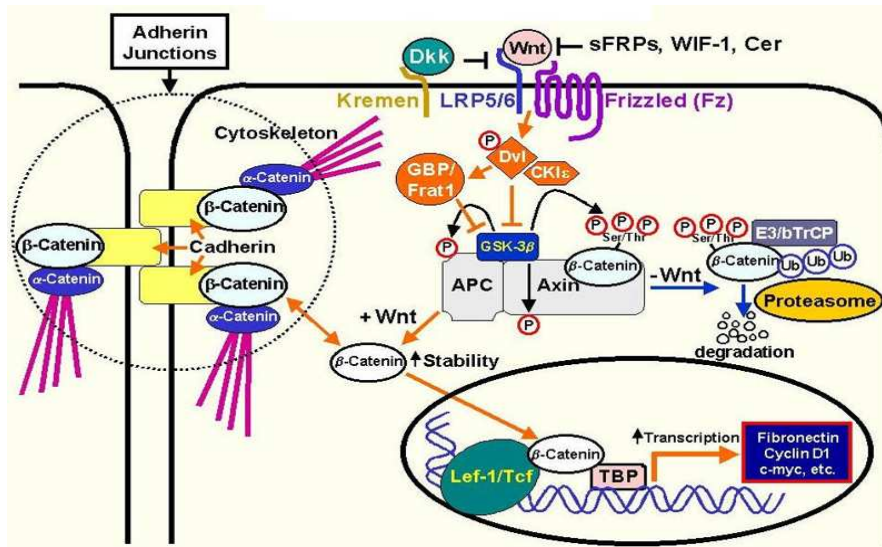


**Figura 15: Vías de señalización celular más relevantes en el desarrollo del CHC.** Las posibles dianas moleculares en la terapia frente al CHC se representan por asteriscos. Los signos ▲ y ▼ representan la inducción o represión de la expresión génica en el CHC comparado con hígados normales.

↪ **Vía de señalización Wnt-β-catenina:** la ruta de señalización Wnt está implicada en la regulación de la proliferación, motilidad, interacciones entre células, en la respuesta regenerativa del hígado y en el mantenimiento de las células troncales. Además, está bien establecido su implicación en la oncogénesis (Reya et al, 2005), por tanto, estas nociones sugieren que los componentes de este ruta serian dianas posibles frente a las células troncales cancerosas. Las Wnts constituyen una familia de 19 ligandos de glicoproteínas secretadas que se unen a 11 receptores transmembrana de la familia Fzd o Frizzled. En las células normales, la β-catenina está asociada a la E-cadherina en la membrana celular, uniendo la E-cadherina al citoesqueleto de actina. En la ruta canónica de Wnt la cascada de señalización se inicia cuando los



ligandos se unen a sus receptores provocando finalmente la disociación de la  $\beta$ -catenina y E-cadherina. El complejo citoplasmático constituido por las proteínas supresoras AXIN y APC (Tumor-suppressor adenomatous polyposis coli) junto con la quinasa GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) será el encargado de fosforilar a la  $\beta$ -catenina, poliubiquitinilada y degradada en el proteosoma [Figura 16] (Aberle et al, 1997; Nelson and Nusse, 2004).

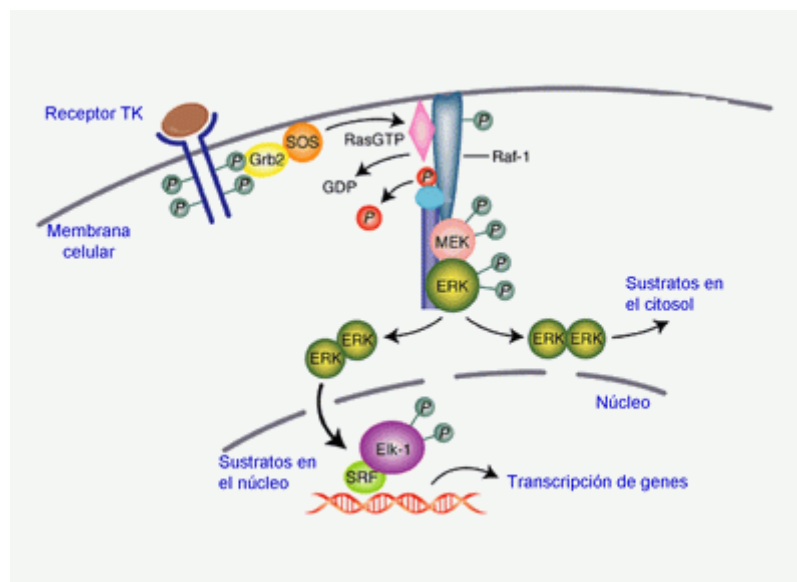


**Figura 16: Vía de señalización celular Wnt.**

La acumulación de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma, debido a mutaciones somáticas en ese complejo citoplasmático o por la sobreexpresión del receptor FZD-7, provoca su translocación al núcleo celular donde se une a los factores de transcripción de la familia TCF/LEF y actúa como coactivador estimulando la transcripción de genes implicados en proliferación celular, como c-myc o c-jun, angiogénesis, como VEGF, antiapoptóticos, como la survivina, metástasis, como metaloproteasas y en la formación de matriz extracelular (Buendía, 2000; Calvisi et al, 2001). Las mutaciones en la  $\beta$ -catenina pueden provocar su acumulación intracelular y su tasa de mutación en el CHC es de 0-44%. También se ha observado que estas mutaciones ocurren durante la fase de desarrollo tumoral y puede contribuir en el desarrollo de fibrosis y cirrosis que precede a la formación del tumor (Feitelson et al, 2002, Edamoto et al,

2003). La sobre-expresión del receptor FZD-7, otra causa de acumulación de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma, se ha observado en los hepatocitos displásicos anteriores al desarrollo de CHC (Merle et al, 2004). La pérdida de heterocigosidad del locus de la E-cadherina o la pérdida de su expresión génica también produce una redistribución de la  $\beta$ -catenina en el núcleo teniendo una importante consecuencia en la angiogénesis, invasión tumoral y metástasis (Calvisi et al, 2004).

↳ **Vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK**: esta vía es una de las cascadas de señalización más críticas de la hepatocarcinogénesis. Esta ruta es esencial para el crecimiento y supervivencia celular y en la transducción de señales extracelulares desencadenadas por la unión ligando-receptor tirosina quinasa o TK, como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidermal o EGFR, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR, receptor del factor de crecimiento insulín-like o IGF1R, receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGFR, entre otros, hasta el núcleo celular a través de una serie de fosforilaciones específicas que comienzan con la activación de la quinasa serina/treonina Ras (Alexia et al, 2004; Sridhar et al, 2005).



**Figura 17: Vía de señalización celular RAS/RAF/MEK/ERK.**

Ras activada desencadena la fosforilación de otras quinasas, Raf, esta activa a MEK1/2, y finalmente se activa ERK1/2 la cual fosforila un amplio rango de efectores implicados en la inmortalización celular, motilidad celular, angiogénesis y resistencia a drogas frente al cáncer [Figura 17] (Wiessenauer et al, 2004; Sridhar et al, 2005).

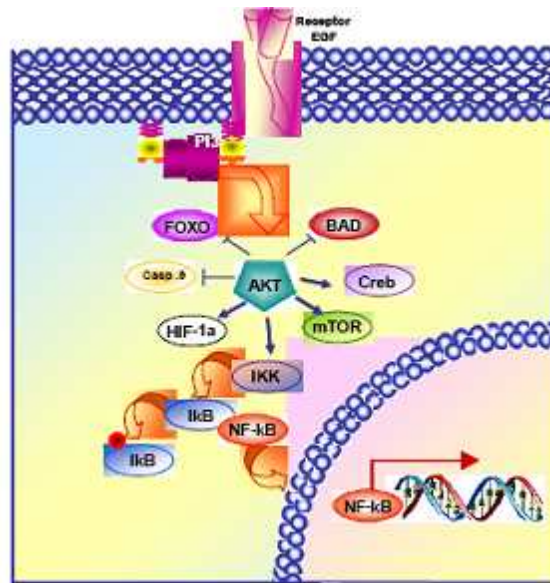
Como hemos comentado en el apartado del tratamiento del CHC con nuevos fármacos, en concreto con sorafenib (PONER PAGINA), su mecanismo de acción es a través del bloqueo de esta ruta de transducción de señales.

↳ **Vía de señalización IGF:** esta vía de señalización está implicada en el desarrollo y progresión de una amplia variedad de tumores participando en los procesos de transformación, proliferación, supervivencia, motilidad y migración celular. El IGF o factor de crecimiento de insulina es uno de los mensajeros secundarios más importantes de la hormona del crecimiento durante la infancia y adolescencia (Pollak et al, 2004). La familia IGF comprende 2 ligandos (IGF-I y IGF-II), 2 receptores (IGFR-I y IGFR-II) y 6 proteínas de unión (IGFBP1-6). La unión de los ligandos a sus receptores desencadena una señal de transducción que conduce a la fosforilación del sustrato del receptor de la insulina (IRS-1 y IRS-2) y de la proteína Shc. A continuación se induce la activación de dos rutas de señalización, la vía de las MAPK y la vía de PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ , y la activación transcripcional de genes como myc, fos y VEGF (Pollack et al, 2004). En muchas neoplasias se ha observado un aumento de expresión del gen IGF-II, entre ellas el CHC, en cuyo caso entre el 16-40% sobreexpresan este factor de crecimiento.

↳ **HGF o factor de crecimiento hepatocítico:** en los hepatocitos el HGF representa el factor de crecimiento más potente y esencial para la regeneración hepática. Su receptor es el conocido c-MET expresado en células epiteliales y endoteliales. Su actividad regula los procesos de proliferación, migración, supervivencia, morfogénesis, angiogénesis y regeneración (Farazo et al, 2006, Breuhahn et al, 2006). En el CHC se

ha observado que tanto el receptor c-MET (entre un 20-48% de los CHC) como el HGF, presentan una sobre-expresión.

↳ **Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR:** la activación de esta vía de señalización juega un papel importante en el desarrollo tumoral (Osaka et al, 2004). La PI3K está directamente asociada con algunos receptores de factores de crecimiento en la superficie celular. Cuando estos receptores se unen a sus ligandos, la quinasa PI3K se activa y genera un segundo mensajero, el PIP3 o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, el cual activa a la quinasa serina/treonina Akt, la cual regula la maquinaria apoptótica a varios niveles, incluyendo la fosforilación e inactivación de proteínas pro-apoptóticas como Bad y caspasa-9, inducción de la expresión de genes de supervivencia dependientes del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y fosforilación de mTOR [Figura 18].



**Figura 18: Dianas de Akt.**

con la proteína raptor a través de la activación de la proteína 4E-BP1 (proteína de unión al factor de iniciación 4E) y de la proteína p70s6k (quinasa S6 proteína ribosomal 40S), las cuales regulan la translación de ARN mensajeros de genes implicados en la proliferación celular y angiogénesis, como c-myc, HIF1-alfa y VEGF (Vignor et al, 2005; Adjei and Hidalgo, 2005). A través de la interacción de mTOR con la proteína rictor regula la supervivencia celular, proliferación, metabolismo y citoesqueleto [Figura 19]. La

mTOR es una quinasa serina/treonina que regula rutas de señalización esenciales y está implicada en el acoplamiento del estímulo de crecimiento y la progresión del ciclo celular. La regulación del crecimiento celular la realiza interaccionando

con la proteína raptor a través de la activación de

quinasa mTOR se ha encontrado sobreexpresada en un 45% de los casos de CHC y su inhibición a través del uso del antibiótico rapamicina ha demostrado una inhibición del crecimiento en células de CHC humano (Sahin et al, 2004). Por otro lado, un regularador de esta ruta de señalización lo representa la fosfatasa PTEN, la cual bloquea la activación de Akt. PTEN es considerado un gen supresor de tumores que frecuentemente se encuentra mutado o delecionado en muchos cánceres, entre ellos el CHC (Hu et al, 2003; Horie et al, 2004).

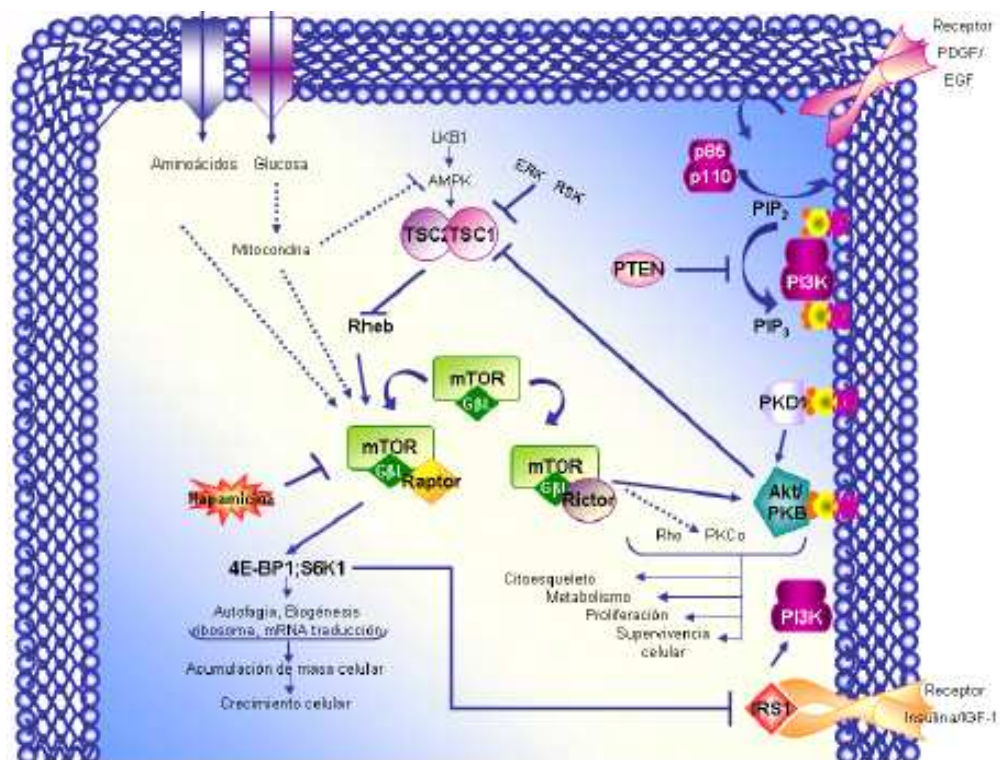


Figura 19: Esquema de la ruta de señalización mTOR y Akt.

↪ **NF- $\kappa$ B**: el factor de transcripción NF- $\kappa$ B está implicado en los eventos tempranos de la hepatocarcinogénesis (Arsura and Cavin, 2005). El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) comprende una familia de factores de transcripción implicados en la regulación de una gran variedad de respuestas biológicas. Es bien conocido su papel en la regulación de la respuesta inmune y de la respuesta inflamatoria. NF- $\kappa$ B regula la expresión de genes relacionados con procesos claves en el desarrollo y

progresión tumoral. En los hepatocitos en reposo, NF- $\kappa$ B se encuentra secuestrado en el citoplasma celular a través de su unión a sus proteínas inhibidoras kappa B (I $\kappa$ B). En respuesta a una gran cantidad de estímulos, como infecciones virales, citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, las proteínas I $\kappa$ B quinasa (IKK) fosforilan a las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B, que serán degradadas en el proteosoma, y de este modo el NF- $\kappa$ B queda libre en el citoplasma desde donde se transloca al núcleo y activa la transcripción génica [Figura 20] (Arsura

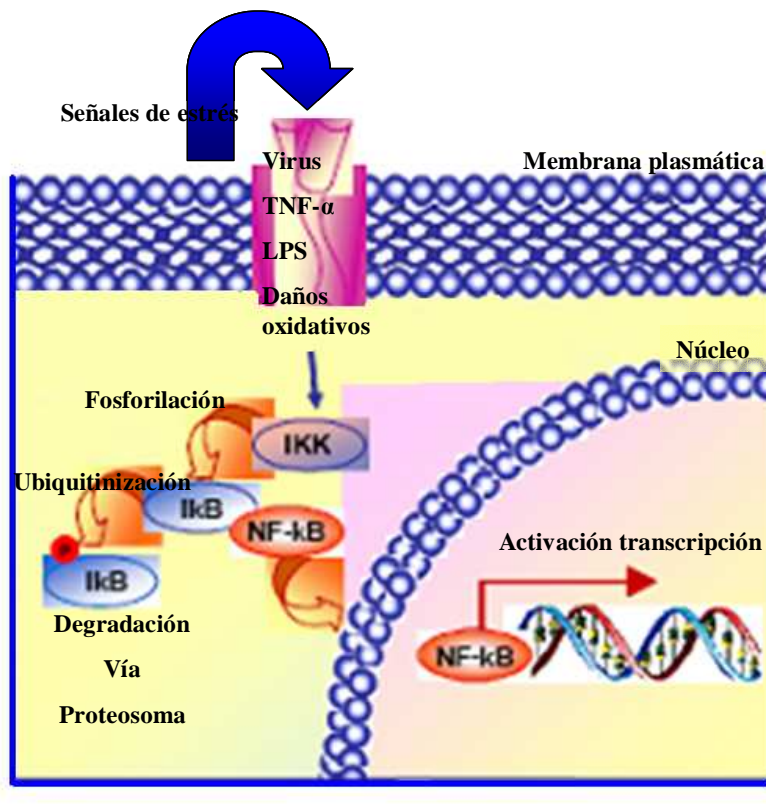


Figura 20: Mecanismo de activación de NF- $\kappa$ B.

and Cavin, 2005; Luo et al, 2005). El NF- $\kappa$ B induce la expresión de genes que inhiben la muerte celular, tanto apoptótica como necrótica, representando de este modo un mecanismo de defensa frente al daño hepático de diversa etiología. La activación persistente durante los estados preneoplásicos confieren supervivencia a los hepatocitos que han adquirido mutaciones oncogénicas y por tanto favorecen la promoción tumoral (Pikarski et al, 2004). De este modo, el NF- $\kappa$ B se considera uno de los mecanismos que establece la relación entre la inflamación crónica y hepatocarcinogénesis (Pikarsky et al, 2004;

Dolcet et al, 2005). La activación del NF- $\kappa$ B, además puede deberse al aumento de expresión de miembros del EGFR, IGFR, TNFR y a la activación de las vías de señalización Ras/MAPK y PI3K/Akt. Como hemos comentado en apartados anteriores, regulación de la transcripción por PARP-1 (PONER pAGINA), este factor de transcripción requiere para su activación interaccionar físicamente con la proteína PARP-1, la cual actúa como un co-activador de NF- $\kappa$ B (Kannan et al, 1999; Simbulan-Rosenthal et al, 2000; Cerverella and Sala, 2000; Oliver et al, 1999; Hassa et al, 2001). De acuerdo a estos conceptos, la inhibición de NF- $\kappa$ B podría ser usada como terapia preventiva y tratamiento del CHC. Inhibidores de IKK como es el análogo de la quinazolina, están recientemente bajo desarrollo preclínico ((Arsura and Cavin, 2005).

↳ **VEGF**: el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF es junto a la angiopoyetina-1, PDGF, IGF y HIF1-alfa, responsable de la neovascularización de los tumores, entre ellos el CHC (Eskens, 2004; Zacharoulis et al, 2005). El proceso de angiogénesis es crucial para la progresión tumoral y posterior invasión y metástasis. La sobreexpresión de VEGF y su sobre-regulación debida al ambiente hipóxico tumoral, se ha detectado en el CHC (Ryan and Wedge, 2005). Por tanto, la principal diana para combatir la angiogénesis tumoral y posterior metástasis está siendo el VEGFR (receptor de VEGF), observándose resultados prometedores en ensayos con ratones desnudos xenotransplantados con CHC (Liu et al, 2005).

#### **4.- PARP-1 Y CARCINOGENESIS.**

Desde el descubrimiento de la reacción de poli (ADP-ribosilación) y de la proteína PARP-1, miembro mejor caracterizado de la familia de proteínas PARPs, numerosos trabajos de investigación han demostrado la implicación de esta proteína en numerosas patologías. Inicialmente, la reacción de poli (ADP-ribosilación) fue descubierta como una respuesta celular inmediata frente al daño generado en el ADN por la acción de agentes genotóxicos. La activación moderada de PARP-1, facilita la reparación eficiente del daño en el ADN generado por agentes alquilantes, especies reactivas del oxígeno o radiación ionizante. En cambio, cuando el estímulo genotóxico es severo, la sobre-activación de PARP-1 conduce a un rápido consumo energético y consecuentemente la célula muere por necrosis. La actividad de PARP-1, en este último caso, la implica en la patogénesis de enfermedades como son la diabetes mellitus, isquemia/reperfusión, shock hemorrágico, shock séptico y desordenes inflamatorios crónicos (artritis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), entre otros. El desarrollo de inhibidores específicos de la actividad e PARP-1 han permitido mostrar los efectos positivos obtenidos en la terapia de estas enfermedades.

Por otro lado, la implicación de PARP-1 en los mecanismos de reparación del ADN, ha permitido desarrollar nuevas estrategias en la terapia frente al cáncer. En el tratamiento tumoral, las principales opciones terapéuticas suelen ser la irradiación y la quimioterapia. Frecuentemente, el problema de estas terapias suele ser la resistencia que presenta los tumores, además de los efectos tóxicos producidos en los tejidos no tumorales. En base a estos datos, PARP-1 ha sido extensamente utilizada como diana para potenciar la eficacia de la radioterapia y quimioterapia (Tentori et al, 2002). El desarrollo de inhibidores cada vez más específicos de la actividad de PARP-1 han resultado ser una estrategia farmacológica de gran utilidad para incrementar la eficacia antitumoral de los agentes quimioterapéuticos que inducen daños en el ADN. En este sentido, se ha estudiado la potenciación de la eficacia de drogas antitumorales alquilantes de interés clínico, como la temozolomida (TMZ), junto con inhibidores de PARP. Tras varios años de estudios *in vitro* obteniendo resultados prometedores en la terapia combinada de inhibidores de PARP y TMZ, actualmente se está evaluando un



ensayo clínico en fase III en gliomas con alto grado de recurrencia y melanoma metastásico, utilizándose el inhibidor de PARP, AG14361. Otros estudios preclínicos *in vivo* han demostrado que los inhibidores de PARP también potencian la actividad antitumoral de los inhibidores de la topoisomerasa I, como el irinotecan, en modelos subcutáneos de tumores xenógrafos de colón (Miknyoczki et al, 2003; Calabrese et al, 2003). Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha podido demostrar como la combinación de inhibidores de PARP y agentes antitumorales inhibidores de la topoisomerasa II, como es la doxorubicina, potencian la eficacia de la terapia antitumoral en un modelo celular de cáncer de mama deficientes en p53 (Muñoz-Gómez et al, 2005). Por el contrario, la combinación de inhibidores de PARP y compuestos de platino, muy utilizados en oncología y, cuyo acción no se basa en la inducción de daños en el ADN, no han dado resultados positivos (Curtin et al, 2004).

Todos los datos anteriormente expuestos y, junto al desarrollo de inhibidores más potentes y específicos de PARP, han demostrado un avance en la terapia del cáncer, desarrollándose una estrategia para potenciar la radio y quimioterapia (Calabrese et al, 2004). Recientemente, dos grupos diferentes han demostrado que los inhibidores de PARP por sí solos, en monoterapia, son eficientes en la eliminación de células tumorales deficientes en BRCA-1 y BCRA-2, proteínas implicadas en la reparación del ADN por recombinación homóloga, provocando inestabilidad cromosómica, detención del ciclo celular y apoptosis (Farner et al, 2005; Bryant et al, 2005). En nuestro grupo también se ha podido demostrar que la inhibición de PARP, ya sea farmacológicamente o por delección genética, previene la progresión tumoral debido a su capacidad de cooperar con la activación de factores de transcripción implicados en el control del crecimiento tumoral, como son AP-1, NF-kB y HIF-1alfa, en un modelo de cáncer epitelial (Martín-Oliva et al, 2006).

La utilización de inhibidores de PARP en la terapia frente al cáncer, además de la beneficiosa potenciación de la eficacia de las drogas antitumorales que dañan el ADN, ofrece otra ventaja, proteger a los tejidos sanos de los efectos citotóxicos de los quimioterapéuticos, en el caso de la terapia combinada. Estos efectos citotóxicos son debidos en parte al estrés oxidativo que se produce por la acción de estas drogas.

Todo lo expuesto anteriormente hace de PARP-1 una diana idónea para las terapias del cáncer, entre ellos, el CHC.



## **BIBLIOGRAFÍA**



Aberle H, Bauer A, Stappert J, et al. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997;16:3797–3804.

Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(26):4293-4300.

Adjei AA, Hidalgo M. Treating cancer by blocking cell signals. *J Clin Oncol* 2005;23:5386–5403.

Akiyama T, et al. Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta-cell regeneration: poly (ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-rybosylation). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:48-53.

Alexia C, Fallot G, Lasfer M, et al. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1003–1015.

Alvarez-Gonzalez R, Watkins TA, Gill PK, et al. Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 1999;193:19-22.

Ame JC, Rolli V, Schreiber V, et al. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 1999;274:17860-17868

Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004;26:882-893.

Anderson MG, Scoggin KE, Simbulan-Rosenthal CM, et al. Identification of poly (ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol* 2000; 74:2169-2177.

Andreone TL, O'Connor M, Denenberg A, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *J Immunol* 2003; 170:2113-2120.

Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, et al. Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* 1999;18:4616-4625.

Arsura M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2005; 229:157–169.

Avila MA, Berasain C, Sangro B, et al. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006, 25; 3866-3884.

Bakondi E, Bai P, Szabo EE, et al. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem Cytochem* 2002;50:91-98.

Banasik M, Komura H, Shimoyama M, et al. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* 1992;267:1569-1575.

Bauer PI, Chen HJ, Kenesi E, et al. Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Lett* 2001;506:239-242.

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5–S16.

Boulikas T. Poly(ADP-ribosylated) histones in chromatin replication. *J Biol Chem* 1990;265:14638-14647.

Bréchet C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004;127:S56–S61.

Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25:3787-3800.

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913–7.

Burkart V, Wang ZQ, Radons J, et al. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med* 1999; 5:314-319.

Burkle A. Poly(ADP-ribosyl)ation: a posttranslational protein modification linked with genome protection and mammalian longevity. *Biogerontology* 2000;1:41-46.

Burkle A. Poly(ADP-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. *Cancer Lett* 2001;163:1-5.

Butler AJ, Ordahl CP. Poly (ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 1999;19:296-306.

Calabrese CR, Almassy R, Barton S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:56-67.

Calabrese CR, Batey MA, Thomas HD, et al. Identification of potent nontoxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotential and pharmacological studies. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7):2711-2718.

Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, et al. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* 1996;24:4387-4394.

Calvisi DF, Factor V, Loi R, et al. Activation of beta-catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res* 2001;61:2085–2091.



Calvisi DF, Ladus S, Conner EA, et al. Activation of beta-catenin provides proliferative and invasive advantages in c-myc/TGF-alpha hepatocarcinogenesis promoted by phenobarbital. *Lab Invest* 2004;84:1137–1147.

Canan Koch SS, Thoresen LH, Tikhe JG, et al. Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure. *J Med Chem* 2002;45:4961-4974.

Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 2006; 1:39-53.

Cervellera MN, Sala A. Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* 2000;275:10692-10696.

Chalmers A, Johnston P, Woodcock M, et al. PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:410-419.

Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;11:39-43.

Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ . Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol* 2005;7:1133-1139.

Clarke MF. Self-renewal and solid-tumor stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:14–16.

Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 2003;3:573–588.

Conde C, Mark M, Oliver FJ, et al. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *Embo J* 2001;20:3535-3543.

Cook BD, Dynek JN, Chang W, et al. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 2002; 22:332-342.

Curtin NJ, Wang LZ, Yiakouvaki A, et al. Novel poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:881-889.

d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, et al. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet* 1999;23:76-80.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999;342 ( Pt 2):249-268.

D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, et al. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 2001;114:3771-3778.

Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, et al. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1891-1898.

Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, et al. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* 2001;268:7-13.

de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, et al. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 1994;138:15-24.

de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:7303-7307.

Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:275–284.

Delaney CA, Wang LZ, Kyle S, et al. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7):2860-2867.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, et al. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005; 446:475-482.

Edamoto Y, Hara A, Biernat W, et al. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer* 2003 ;106:334–341.

Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 1997;3:1089-1095.

Eskens FA. Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br J Cancer* 2004 ;90:1–7.

Factor-1 Activation, during Skin Carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66(11):5744-5756.

Farazi P, DePinho R. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews* 2006;6:674-687.

Farinati F, Demaria M, Fornasiero A, et al. Prospective controlled trial with antiestrogen drug tamoxifen in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 1992;37:659-662.

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434:917–21.

Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:2593–2604.

Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM, et al. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action : enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 2003; 103(3):645-662.

Germain M, Affar EB, D'Amours D, et al. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 1999;274:28379-28384.

Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653:1–24.

Gordon-Shaag A, Yosef Y, Abd El-Latif M, et al. The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J Virol* 2003; 77:4273-4282

Griesenbeck J, Ziegler M, Tomilin N, et al. Stimulation of the catalytic activity of poly(ADP-ribosyl) transferase by transcription factor Yin Yang 1. *FEBS Lett* 1999;443:20-24.

Ha HC, Hester LD, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3270-3275.

Harris TJ, Peifer M. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends in Cell Biol* 2005;15:234–237.

Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, et al. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* 2003;278:45145-45153.

Hassa PO, Covic M, Hasan S, et al. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* 2001;276:45588-45597.

Hassa PO, Hottiger MO. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 1999;380:953-959.

Hassa PO, Hottiger MO. The functional role of poly (ADP-ribose) polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1534-1553.

Horie Y, Suzuki A, Kataoka et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004;113:1774–1783.

Hu TH, Huang CC, Lin PR, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97:1929–1940.

Hussain SA, Ferry DR, El-Gazzaz G, et al. Hepatocellular carcinoma. *Annals Oncology* 2001 ;12 :161-172.

Ishii H, Okuda S, Nose H, et al. Local recurrence of hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection *Cancer* 1996;77:1792-1796.

*J Natl Cancer Inst* 2004;96:56–67.

Kanai Y, Tanuma S, Sugimura T. Immunofluorescent staining of poly(ADP-ribose) in situ in HeLa cell chromosomes in the M phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:2801-2804.

Kannan P, Yu Y, Wankhade S, et al. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 1999;27:866-874.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, et al. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53:3976-3985.

Kawaichi M, Ueda K, Hayaishi O. Multiple autopoly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase. *J Biol Chem* 1981;256:9483-9489.

Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, et al. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 1999;146:917-928.

Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis* 2005 ;25:133–142.

Koo SH, Ihm CH, Kwon KC, et al. Microsatellite alterations in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;146:139-144.

Kraus WL, Lis JT. PARP goes transcription. *Cell* 2003;113:677-683.

Kreimeyer A, Wielckens K, Adamietz P, et al. DNA repair-associated ADP-ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins. *J Biol Chem* 1984;259:890-896.

Kuhnle S, Nicotera P, Wendel A, et al. Prevention of endotoxin-induced lethality, but not of liver apoptosis in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:433-438.

Kun E. Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3867-3872.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, et al. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994;371:346-347.

Leduc Y, Lawrence JJ, De Murcia G, et al. Cell cycle regulation of poly(ADP-ribose) synthetase in FR3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* 1988;968:275-282.

Lee JS, Chu IS, Heo J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004;40:667-676.

Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, et al. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2003;23:5919-5927.

Liang TJ, Heller T. Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S62-S71.

Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:389-396.

Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, et al. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 1995;20:405-411.

Liu X, Yue P, Khuri FR, et al. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 2004;64:5078-5083.

Liu Y, Poon RT, Li Q, et al. Both antiangiogenesis- and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res* 2005; 65:3691-3699.

Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Randomized phase III trial of sorafenib versus placebo in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol*. 2007;25(18S):LBA1.

Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999;19(3):329-338.

Los M, Mozoluk M, Ferrari D, et al. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 2002;13:978-988.

Luo J-L, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death-- a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 2005;115:2625–2632.

Mandir AS, Przedborski S, Jackson-Lewis V, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5774-5779.

Martín-Oliva D, Aquilar-Quesada R, O'Valle F, et al. Inhibition of Poly (ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expresión, including hipoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66(11): 5744-5756.

Masson M, Dierich A, LeMeur M, et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:7303-7307.

Masutani M, Suzuki H, Kamada N, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2301-2304.

Meisterernst M, Stelzer G, Roedor RG. Poly (ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2261-2265.

Mendeleyev J, Kirsten E, Hakam A, et al. Potential chemotherapeutic activity of 4-yodo-3-nitrobenzamide. Metabolic reduction to the 3-nitroso derivative and induction of cell death in tumor cells in culture. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(5):705-714.



Merle P, de la Monte SM, Kim M, et al. Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:1110–1122.

Miknyoczki SJ, Jones-Bolin S, Pritchard S, et al. Chemopotiation of temozolomide, irinotecan and cisplatin activity by CEP-6800, a poly (ADP-ribose)polymease inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2003;2:371-382.

Milam KM, Cleaver JE. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science* 1984;223:589-591.

Miyamoto T, Kakizawa T, Hashizume K. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly (ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biol* 1999;19:2644-2649.

Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D, Aguilar-Quesada R, et al. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J* 2005; 386:119-125.

Nash RA, Caldecott KW, Barnes DE, et al. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 1997;36:5207-5211.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004 ;303:1483–1487.

Nie J, Sakamoto S, Song D, et al. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* 1998;424:27-32.

Nirodi C, et al. A role for poly (ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression *J Biol Chem* 2001;276:9366-9374.

Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, et al. Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:108-111.

Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 1999;18:4446-4454.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 2004;9:667–676.

Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3059-3064.

Pikarski E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461–466.

Plaza S, Aumercier M, Bailly M, et al. Involvement of poly (ADP-ribose)-polymerase in the Pax-6 gene regulation in neuroretina. *Oncogene* 1999;18:1041-1051.

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson S. Insulin-like growth factor and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004;4:505-518.

Purnell MR, Whish WJ. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* 1980;185:775-777.

Rawling JM, Alvarez-González R. TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor is a substrate for poly(ADP-ribosylation). *Biochem* 1997;324:249-253.

Ruf A, Menissier de Murcia J, de Murcia G, et al. Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7481-7485.

Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, et al. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004;10:8421–8425.

Sandro B, Ruíz J, Qian C, et al. Terapia génica de las enfermedades digestivas. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23:394-402.

Sbodio JI, Lodish HF, Chi NW . Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J* 2002;361:451-459.

Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, et al. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:550-556.

Schreiber V, de Murcia G, de Murcia JM. A eukaryotic expression vector for the study of nuclear localization signals. *Gene* 1994;150:411-412.

Schreiber V, Hunting D, Trucco C, et al. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4753-4757.

Seimiya H .The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 2006;94:341-345.

Sell S. Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:419-424.

Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 2000; 460:1-15.

Shiobara M, Miyazaki M, Ito H, et al. Enhanced polyadenosine diphosphate-ribosylation in cirrhotic liver and carcinoma tissues in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(3):338-344.

Simbulan-Rosenthal CM, Ly DH, Rosenthal DS, et al. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11274-11279.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz H, et al. The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry* 1996;35:11622-11633.

Smith S, de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 2000;10:1299-1302.

Smith S, Giriati I, Schmitt A, et al. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998; 282:1484-1487.

Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2005; 4:677-685.

Suzuki H, Quesada P, Farina B et al. In vitro poly(ADP-ribosylation) of seminal ribonuclease. *J Biol Chem* 1986;261:6048-6055.

Szabo C, Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:287-298.

Tanaka S, Toh Y, Adachi E, et al. Tumor progression in hepatocellular carcinoma may be mediated by p53 mutation. *Cancer Res* 1993;53:2884-2887.

Tanuma S, Yagi T, Johnson GS. Endogenous ADP ribosylation of high mobility group proteins 1 and 2 and histone H1 following DNA damage in intact cells. *Arch Biochem Biophys* 1985;237:38-42.

Tanuma SI, Enomoto T, Yamada MA. Changes in the level of poly ADP-ribosylation during a cell cycle. *Exp Cell Res* 1978;117:421-430.

Tentori L, Portarena I, Graziani G, et al. Potential clinical applications of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol Res* 2002; 45:73-85.

Trucco C, Oliver FJ, de Murcia G, et al. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res* 1998;26:2644-2649.

Tulin A, Spradling A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* 2003;299:560-562.

Valera M, Real MI, Burrel M, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: Efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007; 46(3):474-481.

Velásquez RF, Rodríguez M, Navascues CA, et al. Prospective análisis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrosis. *Hepatology* 2003; 37(3):520-527.

Vignot S, Faivre S, Aguirre D, et al. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005;16:525–537.

Villanueva A, Newell P, Chiang D, et al. Genes and signaling pathways involved in the pathogenesis of HCC. *Semin Liver Dis* 2007;27:55-76.

Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002;54:375-429.

Virag L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3:209-214.

Wang H, Shimoji M, Yu SW, et al. Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;991:132-139.

Weltin D, Marchal J, Dufour P, et al. Effect of 6(5H)-phenanthridinone, an inhibitor of poly(ADP-Ribose) polymerase, on cultured tumor cells. *Oncol Res* 1994;6(9):399-403.

Wesierska-Gadek J, Schmid G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell Mol Biol Lett* 2001;6:117-140.

Whitacre CM, Hashimoto H, Tsai ML, et al. Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences. *Cancer Res* 1995;55:3697-3701.

Wiesenauer CA, Yip-Schneider MT, Wang Y, et al. Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2004;198:410–421.

Yu SW, Wang H, Dawson TM, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2003;14:303-317.

Yu SW, Wang H, Poitras MF, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297:259-263.

Zacharoulis D, Hatzitheofilou C, Athanasiou E, et al. Antiangiogenic strategies in hepatocellular carcinoma: current status. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005;5:645–656.



## **PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**





## **ANTECEDENTES**

La proteína PARP-1 ha sido relacionada con los procesos de muerte celular a diferentes niveles, con ciertas patologías de origen inflamatorio y con la regulación de la transcripción de genes implicados en la oncogénesis. Así, en condiciones de daño genotóxico moderado, la activación de procesos de reparación en los que participa PARP-1 pueden suponer una resistencia frente a la terapia antitumoral. Se ha demostrado que la inhibición de PARP está asociada con el incremento de sensibilidad frente a agentes alquilantes, radiación ionizante e inhibidores de la topoisomerasa I y II. Sabemos también que en presencia de un elevado número de lesiones en el ADN, la sobre-activación de PARP-1 induce la activación de procesos de muerte celular y, simultáneamente, induce la activación de diversos factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, incrementando la expresión de genes dependientes de estos. Ambas condiciones contribuyen al desarrollo de ciertas patologías de origen inflamatorio (ictus cerebral, isquemia de miocardio, diabetes, disfunción cardíaca asociada a diabetes, choque séptico, artritis, colitis, etc.). Por otro lado, es bien conocido que los fenómenos de inflamación crónica favorecen el desarrollo tumoral, como es el caso de las infecciones crónicas por VHC y VHB, factores principales de riesgo de desarrollar CHC. De este modo, la inhibición farmacológica de PARP-1 se presenta como una diana atractiva en el tratamiento de los fenómenos de inflamación crónica y, como consecuencia, frente al desarrollo tumoral.

## **HIPÓTESIS**

Debido a la interesante implicación de PARP-1 en los procesos de muerte celular y en la regulación de la transcripción génica relacionados con los fenómenos de inflamación y cáncer indicadas nos parece de gran interés:

1. Conocer la capacidad de la activación de PARP-1 en la sensibilización frente a agentes antitumorales utilizados en la práctica clínica en un modelo tumoral de hepatocarcinoma humano.
2. Identificar la posible relación de PARP-1 en la progresión e invasión tumoral en un modelo de carcinoma hepatocelular humano a través de su capacidad de

regular la transcripción de genes implicados fundamentalmente en cáncer, angiogénesis y metástasis.

Las ideas anteriores han dado origen a la hipótesis de este trabajo que formulamos a continuación:

La proteína PARP-1 participa en las etapas de iniciación, progresión y metástasis tumoral del carcinoma hepatocelular humano a través de la regulación de la transcripción génica.

## **OBJETIVOS**

Para verificar la hipótesis anterior hemos realizado el trabajo que aquí se presenta y que resumimos enunciando sus objetivos:

1. Estudiar en modelos celulares de hepatocarcinoma humano y hepatocitos no transformados la activación de PARP-1 tras el tratamiento con el inhibidor de la topoisomerasa II, doxorubicina.
2. Estudiar el efecto de la inhibición de PARP-1 tras el tratamiento con el inhibidor de la topoisomerasa II, doxorubicina, en un modelo celular de hepatocarcinoma humano a largo plazo.
3. Comparar la susceptibilidad a la hepatocarcinogénesis química inducida mediante tratamiento con el carcinógeno químico dietilnitrosamina en ratones *parp-1* parentales tratados o no con el inhibidor específico de PAR-1, 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona, DPQ.
4. Analizar la actividad proliferativa de los hepatocitos de los ratones sometidos a hepatocarcinogénesis químicas tratados o no farmacológicamente con el inhibidor DPQ.

5. Determinar a nivel molecular la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la expresión de marcadores tumorales en las etapas tempranas de la hepatocarcinogénesis.
6. Analizar histológicamente los hepatocarcinomas xenotransplantados en un modelo de ratones desnudos tratados o no farmacológicamente con el inhibidor DPQ.
7. Analizar el perfil de expresión génica en un modelo de hepatocarcinoma xenotransplantado, tratado o no con el inhibidor DPQ.
8. Identificar genes dependientes de PARP-1 implicados en la hepatocarcinogénesis.

El trabajo que se resume en esta memoria de Tesis Doctoral pretende contribuir al mejor conocimiento de la proteína PARP-1 y su implicación en la regulación de la transcripción génica, además de presentar una novedosa diana molecular frente al hepatocarcinoma, y en un futuro, como una diana preventiva en las cirrosis hepáticas.



## **CAPÍTULO I:**

**LA TERAPIA COMBINADA DEL  
QUIMIOTERAPÉUTICO DOXORUBICINA E  
INHIBIDORES DE PARP-1 POTENCIAN LA MUERTE DE  
CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO.**



## 1.1.- RESUMEN.

La proteína nuclear PARP-1 está implicada en los procesos de reconocimiento y reparación de las lesiones que afectan al ADN. PARP-1 es capaz de detectar y unirse rápidamente a roturas de cadena simple y doble en el ADN, generados por diferentes agentes genotóxicos. Cuando el daño es moderado, la rápida activación de PARP-1 facilita la reparación de la lesión a través de los complejos proteicos implicados en los mecanismos de reparación del ADN (BER o Reparación por Escisión de Bases; SSBR o Sistema de Reparación de Daños de Cadena Simple) y ello permite la supervivencia celular. Sin embargo, en los casos de daños elevados, la sobre-activación de PARP-1 induce una disminución en los niveles de  $\text{NAD}^+$  y ATP produciendo un colapso energético y muerte celular por necrosis. La inhibición farmacológica de PARP-1 mediante el uso de inhibidores de su actividad enzimática ha constituido una diana apropiada para potenciar la actividad de las drogas antitumorales que dañan el ADN, retrasando e impidiendo los intentos de reparación de los mismos y por tanto reduciendo los intentos de supervivencia además de actuar favorablemente inhibiendo la necrosis y potenciando la apoptosis, reduciendo los efectos secundarios adversos asociados a los procesos inflamatorios. En este capítulo hemos investigado el efecto potenciador de la actividad citotóxica de doxorubicina en diferentes líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma humano tratadas con el inhibidor químico de PARP (4-amino 1,8-naftalimida, ANI).

Nuestros datos demuestran que doxorubicina induce una rápida activación de PARP y una moderada muerte celular que es potenciada considerablemente mediante el uso de inhibidores químicos de PARP. La magnitud de la potenciación es de 2.9 veces en ensayos de muerte realizados a 48 horas y de 200 veces mediante ensayos de formación de colonias (20 días tras el tratamiento), en línea celular HepG2, altamente resistentes a la terapia antitumoral. Se ha demostrado que esta potenciación de la muerte celular inducida por doxorubicina tras el tratamiento con el inhibidor de PARP también ocurre en otras líneas celulares de hepatocarcinoma humano (Hep3B y PCL/PRF/5). Es de destacar el hecho de que no se ha observado potenciación de la muerte celular tras el tratamiento con inhibidores de PARP y doxorubicina en la línea de hepatocitos no



tumorales, WRL-68. Por otro lado, la muerte celular por apoptosis se ve incrementa mediante el uso de inhibidores de PARP tras el tratamiento con doxorubicina.

Mediante la inhibición de PARP se puede conseguir una potenciación de la actividad citotóxica de doxorubicina, a dosis bajas, en líneas celulares de hepatocarcinoma altamente resistentes a quimioterapia, a través de la inhibición de la reparación del ADN, la acumulación del daño en el genoma y por tanto aumento de la muerte celular por apoptosis. La inhibición de PARP mediante el uso de inhibidores químicos a las concentraciones utilizadas, no afectan a la viabilidad de las células no tumorales. Este hecho resulta de especial importancia para la posible aplicación clínica de los inhibidores farmacológicos de PARP en la terapia frente al CHC por dos razones principales: 1) potenciación del efecto quimioterapéutico doxorubicina a dosis bajas; 2) reducción de la toxicidad tan elevada en este tipo de terapias.

## 1.2.- INTRODUCCIÓN

La hepatocarcinogénesis es un proceso dinámico distribuido en varias etapas caracterizadas por ciclos de muerte celular y regeneración tisular de la zona dañada que determinan que el ADN de los hepatocitos sea más vulnerable a alteraciones genéticas contribuyendo al desarrollo tumoral. El CHC presenta una gran variedad de factores etiológicos, aunque sus principales factores de riesgo son la infección por el virus de la hepatitis C y de la hepatitis B. En el 80% de los casos, aparece sobre un hígado cirrótico y debido a su pobre diagnóstico, las opciones terapéuticas para los pacientes son poco esperanzadoras. Con algunas excepciones, la quimioterapia es generalmente inefectiva a la dosis utilizada (Nowak AK et al, 2004), resultando ser altamente tóxica, con valores inaceptables de mortalidad, a dosis elevadas. La inefectividad del tratamiento es debida a la resistencia del CHC a las terapias existentes por su alta carga mutacional, hecho que le confiere la citada resistencia a las drogas antitumorales (Chenivresse X et al, 1993). La doxorubicina es el agente quimioterapéutico más frecuentemente usado en el CHC, sólo o en combinación con otros fármacos (Lai CL et al, 1988; Friedman MA et al, 1983).

La proteína PARP-1 [poli (ADP-ribosa) polimerasa-1], es el principal miembro de una familia de enzimas que poseen la capacidad de modificación post-traducciona l de proteínas por poli (ADP-ribosilación) (Ame et al. 2004). Hasta la fecha se han identificado 18 miembros que presentan homología de secuencia con el dominio catalítico de PARP-1, aunque sólo se conocen las propiedades enzimáticas y bioquímicas de algunos miembros de la familia PARP. PARP-1, miembro mejor caracterizado, es una proteína nuclear altamente expresada, que es capaz de detectar y unirse rápidamente a roturas de cadena simple y doble en el ADN, generadas por diferentes agentes genotóxicos. La unión de PARP-1 a las roturas en el ADN, activa la capacidad catalítica del enzima y tras dicha activación se realiza la modificación por unión covalente de polímeros de ADP-ribosa sobre diferentes proteínas nucleares implicadas principalmente en el *mantenimiento de la arquitectura de la cromatina* y la *reparación de daños* en el ADN. Se ha descrito que PARP-1 se asocia in vivo con XRCC1, una proteína de reparación del ADN, que junto con la DNA polimerasa  $\beta$  y la DNA ligasa III están implicadas en el sistema de Reparación por Escisión de Bases (BER) (Dantzer et al. 2000). Deficiencias en PARP-1 ocasionan defectos en los procesos de reparación mediados por BER y predisponen hacia la inestabilidad

genómica, sugiriendo que PARP-1 juega un papel primordial en la respuesta celular a daños en el ADN (de Murcia et al. 1997; Shall and de Murcia 2000).

PARP-1, además de ser el miembro mejor caracterizado de la familia de proteínas PARP, es el principal responsable en cuanto a los procesos de reparación y el de mayor actividad catalítica del grupo. Otro miembro a destacar de la familia PARP es la proteína PARP-2 que posee una gran semejanza con el dominio catalítico de PARP-1, presentando un 69% de homología. Otras diferencias conocidas entre ambas proteínas están presentes a nivel del dominio de unión al ADN, que conlleva a la detección de diferentes daños en el ADN (Ame et al, 2004). PARP-2 actúa como un modificador de la estructura de la cromatina e interacciona con PARP-1 en los procesos de reparación BER y SSBR (sistema de reparación de roturas simples de cadena). PARP-1 y PARP-2 son los únicos miembros de la familia PARP implicados en la reparación del daño en el ADN, y por tanto, la inhibición de su actividad enzimática es la responsable de la sensibilización frente a la terapia antitumoral de los agentes genotóxicos.

Se ha suscitado un gran interés en el desarrollo de nuevos compuestos químicos con actividad inhibitoria de PARP debido a las potenciales aplicaciones clínicas de los mismos en patologías de origen inflamatorio (Virag and Szabo 2002; Beneke et al. 2004; Curtin 2005; Graziani et al. 2005). ANI (4-amino-1,8-naftalimida) representa uno de los compuestos de última generación y actúa como un potente inhibidor de la actividad de PARP ( $IC_{50} = 180$  nM). Estudios realizados con ANI sobre modelos celulares de carcinoma de próstata humano *in vitro* y en modelos de xenógrafos en ratones inmuno-suprimidos con radiación ionizante, muestran una potenciación de los efectos citotóxicos producidos por la radiación (Schlicker et al. 1999; Noel et al. 2006). Además, el uso de diferentes inhibidores de PARP junto con diferentes agentes genotóxicos como los inhibidores de la topoisomerasa-I (topotecan) así como diversos agentes alquilantes (MMNG, MNU y temozolomida), produce el mismo efecto sensibilizador (Calabrese et al. 2004; Smith et al. 2005). Sin embargo, la información científica disponible sobre el tratamiento combinado con los inhibidores de la topoisomerasa II y PARP es controvertida y nada concluyente (Tentori and Graziani 2005). Entre otras cosas se ha descrito que el tratamiento con inhibidores de PARP no repercute en ningún efecto de sensibilización de la citotoxicidad inducida por el compuesto etopóxido (inhibidor de la topoisomerasa II) (Bowman et al. 2001). No obstante, líneas celulares deficientes en PARP-1 presentan una elevada sensibilidad a C-1305, un nuevo compuesto inhibidor de la topoisomerasa II (Wesierska-Gadek et al.

2004). En los últimos años, trabajos publicados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que el tratamiento con el inhibidor de PARP (ANI) sensibiliza a células de cáncer de mama deficientes en p53 a la apoptosis inducida por doxorubicina (Muñoz-Gamez JA et al, 2005, Muñoz-Gómez JA et al, 2008).

El objetivo del presente estudio ha sido determinar si el tratamiento con inhibidores de PARP (ANI) puede constituir una nueva terapia antitumoral mediante la potenciación el efecto citotóxico de doxorubicina, una potente antraciclina muy utilizada en protocolos clínicos antitumorales que actúa como inhibidor de la topoisomerasa II, en modelos celulares de hepatocarcinoma humano. Nuestros resultados demuestran que doxorubicina produce una rápida activación de PARP-1 y una moderada muerte celular, la cual resulta considerablemente potenciada por la adición ANI.

Por otra parte, el uso de inhibidores de PARP protege los tejidos normales no tumorales de los efectos tóxicos derivados del uso de la quimioterapia. El principal problema del uso de las antraciclinas y en concreto de la doxorubicina es la toxicidad cardiaca que presenta. El uso de inhibidores de PARP protege de los efectos cardiotóxicos producidos por doxorubicina, tanto a corto plazo, como los que aparecen tiempo después del cese del tratamiento, sin reducción del efecto sensibilizador de la citotoxicidad de esta antraciclina (Pacher et al. 2002; Szenci et al. 2005). Otro ejemplo lo constituye el efecto protector de los inhibidores de PARP frente a los efectos secundarios de toxicidad de riñón originada por el uso de anti-neoplásico cisplatino, sin afectar a su eficacia antitumoral (Racz et al. 2002).

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la inhibición de PARP puede representar una forma novedosa de sensibilizar células de hepatocarcinoma humano al tratamiento con doxorubicina y de evitar los posibles efectos adversos derivados del uso de las antraciclinas.



### **1.3.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **1.3.1.- Cultivos celulares**

Las líneas celulares utilizadas durante el desarrollo del presente capítulo son las siguientes: HepG2, Hep3B, PCL/PRF/5 (derivadas de hepatocarcinoma humano) y WRL-68 (células de hígado de embrión humano), suministradas por el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las células HepG2 y Hep3B se han cultivado en medio de cultivo RPMI (Gibco) suplementado con 2mM de glutamina, 10% de suero bovino fetal (FBS) y 40 µg/l del antibiótico gentamicina en un incubador a 37°C en una atmósfera saturada de humedad con el 5% en CO<sub>2</sub>. Las células WRL-68 y PCL/PRF/5 han sido cultivadas en medio de cultivo DMEN (Gibco) suplementado con 2mM de glutamina, 10% de suero bovino fetal (FBS) y 40 µg/l del antibiótico gentamicina en un incubador a 37°C en una atmósfera saturada de humedad con el 5% en CO<sub>2</sub>.

Para llevar a cabo los distintos ensayos las células fueron sembradas 24 horas antes del tratamiento con doxorubicina, encontrándose en fase de crecimiento exponencial.

#### **1.3.2.- Doxorubicina e inhibidores de PARP-1**

Las células se trataron con doxorubicina (Ferrer Farma) a la concentración indicada en cada gráfico durante una hora en medio RPMI o DMEN suplementado con 10% de FBS a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

El inhibidor de PARP-1 o 4-amino-1,8-naftalimida, ANI (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) se utilizó a una concentración de 10 µM disuelto en DMSO. Las células fueron pretratadas dos horas antes del tratamiento con doxo. ANI estuvo presente en el medio de cultivo durante todo el tiempo que duró el experimento.

### **1.3.3.- Análisis de la viabilidad celular. Ensayo MTT.**

La viabilidad celular se ha determinado por el método colorimétrico MTT, basado en la capacidad de las células vivas de metabolizar el MTT, sal de tetrazolio, por las deshidrogenasas mitocondriales y originar cristales de formazan. Esos cristales de formazan son solubilizados y originan una disolución coloreada que se cuantifica en un espectrofotómetro multiplacas (Triad Multimode Reader). De este modo, las células activas metabólicamente (células vivas) procesan el compuesto MTT y dan una solución de color marrón mientras que las células no activas (células muertas) producen una solución amarilla, color del MTT. Para estos ensayos se ha utilizado el kit "Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las células se sembraron 24 horas antes del tratamiento con una densidad de 10.000 células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos (Nunc). Transcurridas 48 horas del tratamiento, las células se trataron con 10 µl de la solución de MTT y se incubaron 4 horas a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se adicionaron 100 µl/pocillo del tampón de solubilización del MTT con el objetivo de disolver los cristales de formazan formados. Esta solución se incubó toda la noche a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Los productos de formazan solubilizados se cuantificaron en el lector espectrofotométrico de placas multipocillos, midiendo la absorbancia a 595 nm de longitud de onda. Las células control, las cuales no recibieron ningún tratamiento durante el proceso, son consideradas como el 100% de viabilidad celular.

### **1.3.4.- Análisis de la muerte celular y apoptosis.**

La muerte celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico conocido como trypan blue (Freshney, R. 1987). Las células se sembraron 24 horas antes del tratamiento con una densidad de 100.000 células por condición en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc). Transcurridas 48 horas del tratamiento, las células se recogieron usando Tripsina-EDTA, se lavaron y resuspendieron en PBS 1X a 4°C. Las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. A continuación, el pellet obtenido se resuspendió en 50 µl de PBS 1X. A las células resuspendidas se le añadió 50µl de la

solución de trypan blue (1:4, trypan blue en PBS) y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. El recuento celular se realizó con un microscopio óptico (Olympus).

La apoptosis se determinó mediante mediante citometría de flujo a través de la técnica de Annexin-V-FLUOS (Roche). La anexina es una proteína de unión a fosfolípidos con alta afinidad por la fosfatidilserina y su conjugación con un fluorocromo, como la fluoresceína, permite ser detectada en el citómetro. El fosfolípido fosfatidilserina (PS) en condiciones normales se localiza en la cara interna de la membrana plasmática, pero cuando la célula inicia el proceso apoptótico este fosfolípido es relocalizado a la cara externa, donde se le unirá la anexina.

Las células se sembraron 24 horas antes del tratamiento con una densidad de 100.000 células/condición en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc). Transcurridas 48 horas del tratamiento, las células se recogieron usando Tripsina-EDTA. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 1.500 r.p.m 5 minutos, a continuación se lavó el precipitado celular obtenido con PBS 1X y se procedió a un nuevo ciclo de centrifugación. Tras retirar el sobrenadante, se adicionaron 100 µl del buffer de anexina (Hepes 0.5 mM, NaCl 5 M. CaCl<sub>2</sub> 2.5 M y agua bidestilada) junto con 2 µl de annexin-V a cada tubo y se incubó dicha preparación durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 100 µl del buffer de anexina y se analizó la externalización de la PS por citometría de flujo en el citómetro tri-laser FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) mediante el análisis de la población en FL1 en la que la emite Annexin-V-FLUOS, usando el software CellQuest (Becton Dickinson Mountain View, CA, U.S.A).

### **1.3.5.- Ensayos de formación de colonias**

Se realizaron ensayos de formación de colonias en la línea tumoral HepG2, con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento combinado de doxo con Inhibidores de PARP sobre la supervivencia celular a largo plazo. Para lo cual, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a las siguientes concentraciones: 500, 1000, 2000, 4000, 5000 y 10000 células/ml. Transcurridas 24 horas de la siembra, las células se



trataron con doxorubicina a concentraciones crecientes de 0, 0.005, 0.05, 0.5 y 1 µg/ml, durante 1 hora. Posteriormente las células se incubaron con ANI (10 µM) durante todo el tiempo que duró el tratamiento. Tras 15-20 días, se procedió al recuento de las colonias formadas, el criterio seguido para dicho análisis fue el siguiente: agrupación celular constituida por 50 o más células. Transcurrido este tiempo se procedió a la fijación celular y a su posterior tinción, para lo cual las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se fijaron y marcaron con la solución de violeta de genciana (Sigma) al 2% en alcohol absoluto durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación el colorante es retirado, se lavan las placas con agua y se dejan secar. La fracción de supervivencia se determinó a partir del número de células sembradas de partida y el número de colonias formadas tras el tratamiento y corregida por la eficiencia de formación de colonias de los controles (células no sometidas a tratamiento)

$$\text{Fracción de supervivencia (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias formadas} \times 100}{n^{\circ} \text{ células sembradas} \times EC}$$

$$\text{Eficiencia de clonaje del control (EC)} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias formadas (control)}}{n^{\circ} \text{ células sembradas (control)}}$$

### **1.3.6.- Detección de proteínas por western blot.**

Las células pegadas en los frascos de cultivo se despegaron mediante raspado mecánico y se lavaron con la solución PBS 1X a 4°C. Posteriormente se resuspendieron en 50 µl de solución de lisis (50mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 12.5 mM β-mercaptoetanol) durante 30 minutos a 0°C. Los restos membranosos y de ADN se eliminaron por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificaron la concentración de proteínas totales mediante el método Bradford. Para ello se realizó una curva patrón de concentraciones crecientes de BSA (Sigma), desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml sobre la cual se interpoló el valor resultante de 1 µl de extracto celular en 200 µl de solución Bradford 1X (Bio-Rad), los ensayos se realizaron por triplicado. La densidad óptica resultante se midió a 596 nm en un detector espectrofotométrico de placas multipocillo. Estos valores sirvieron de referencia para ajustar la concentración de proteínas de los diferentes extractos celulares. Una vez igualada la concentración a

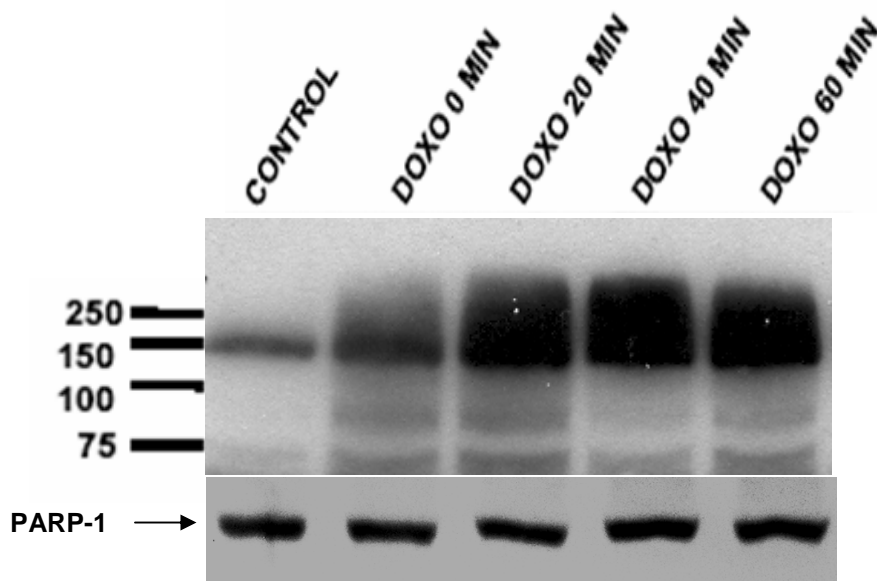
50  $\mu$ g para cada muestra, se añadió tampón de carga de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6M urea, 6%  $\beta$ -mercaptoetanol, 3% SDS, 0.003% azul de bromofenol). Posteriormente se realizó una electroforesis mediante gel de SDS-poliacrilamida al 12% para separar las proteínas que se transfirieron después a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) a 100 mA durante 45 minutos. Para disminuir la fijación inespecífica de anticuerpos, la membrana fue bloqueada con una solución de leche en polvo al 5% en tampón PBS 1X con 0.1% Tween-20 durante 30 minutos y posteriormente incubada durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente: anti-poli (ADP-ribosa) (PAR) (BIOMOL), anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma). Tras esta incubación se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con tampón PBS/Tween 0.1%. Finalmente la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa HRP. Posteriormente se procedió a un ciclo de tres lavados con tampón PBS/Tween 0.1% y las bandas fueron visualizadas con el reactivo ECL-Plus (Amersham Biosciences), el cual junto con la peroxidasa del anticuerpo secundario produce quimioluminiscencia que se registra utilizando el sistema de análisis de imagen ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).



## 1.4.- RESULTADOS

### 1.4.1.- El tratamiento con doxorubicina induce la activación de PARP-1

Se ha descrito que la proteína PARP-1 se activa en respuesta a diferentes agentes genotóxicos que producen daños en el ADN, entre los cuales se encuentra la doxorubicina (modelo de cáncer de mama: Muñoz-Gamez, JA. et al, 2005, modelo de fibroblastos murinos, Muñoz-Gamez, JA. et al, 2008), quimioterápico frecuentemente utilizado en la terapia actual frente al CHC, entre otros tumores. Los daños producidos en el ADN de las células tumorales al ser tratadas con doxorubicina, son reparados a través de los diferentes mecanismos de reparación del ADN, entre los que se encuentra el sistema de reparación por Escisión de Bases (BER), sistema en el que participa activamente PARP-1. Por lo tanto, debido a la activación de PARP-1 por parte de doxorubicina, se favorece la resistencia de las células tumorales a la terapia antitumoral. Para estudiar si la doxorubicina es capaz de activar PARP-1 en las células de CHC humano, hemos tratado a las células HepG2 con doxorubicina a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  durante una hora, transcurrida la cual, se ha analizado la activación de PARP-1 mediante western blot frente al polímero de poli (ADP-ribosa) a diferentes tiempos. Como se puede observar en la figura 1, la doxorubicina induce la rápida activación de PARP-1 en un modelo de células tumorales de CHC.



---

**Figura 1: Activación de PARP-1 inducida por el tratamiento con doxorubicina.**

Western blot de la activación de PARP-1 medida a través de la formación del polímero PAR a distintos tiempos tras el tratamiento con doxo en las células HepG2. El tratamiento con doxo 5 µg/ml fue de 1 hora. PARP-1 fue usado como control de carga.

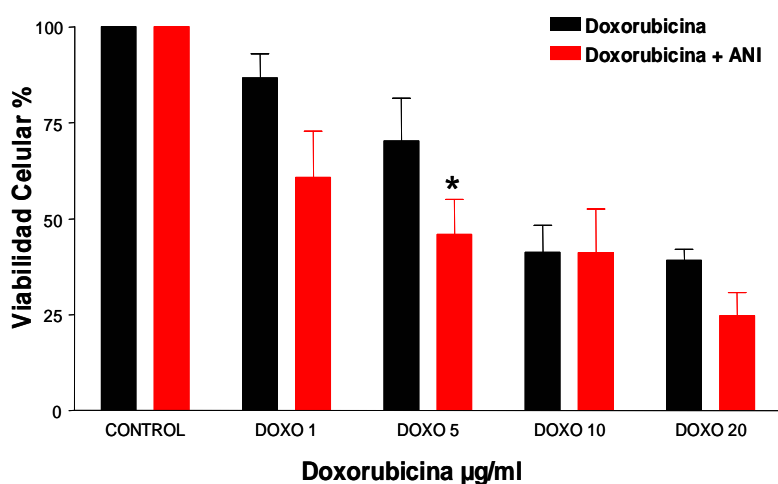
---

**1.4.2.- La terapia combinada de doxorubicina e inhibidores de PARP-1 disminuyen la viabilidad, potenciando la muerte celular de líneas tumorales de CHC y no afecta a las líneas no tumorales.**

En el presente trabajo hemos estudiado el efecto del tratamiento combinado del inhibidor de PARP, ANI, con el quimioterapéutico doxorubicina, en diferentes líneas celulares de CHC (HepG2, Hep3B y PCL/PRF/5) y en la línea de células no tumorales, WRL-68. Se realizaron ensayos de dosis-respuesta a diferentes concentraciones de doxo mediante el método colorimétrico del MTT (48 horas después del tratamiento), sobre la línea celular HepG2, con el objetivo de obtener información y elegir la dosis del fármaco para la cual estas células resultan afectadas por el tratamiento. Los resultados obtenidos nos muestran que estas células son resistentes al efecto citotóxico de la doxorubicina, confirmando los resultados bibliográficos que indican su limitada respuesta a agentes quimioterapéuticos. Los resultados muestran que dichas células son parcialmente resistentes a la dosis de 1µg/ml y que doxorubicina comienza a tener cierta toxicidad a la dosis de 5µg/ml (dosis elegida para el estudio de sensibilización con inhibidores). El efecto citotóxico de doxorubicina a las diferentes dosis se ve incrementado significativamente con el tratamiento combinado con el inhibidor de PARP (pretratamiento, 10 µM), observándose el máximo efecto con la dosis de doxo de 5µg/ml (Figura 2).

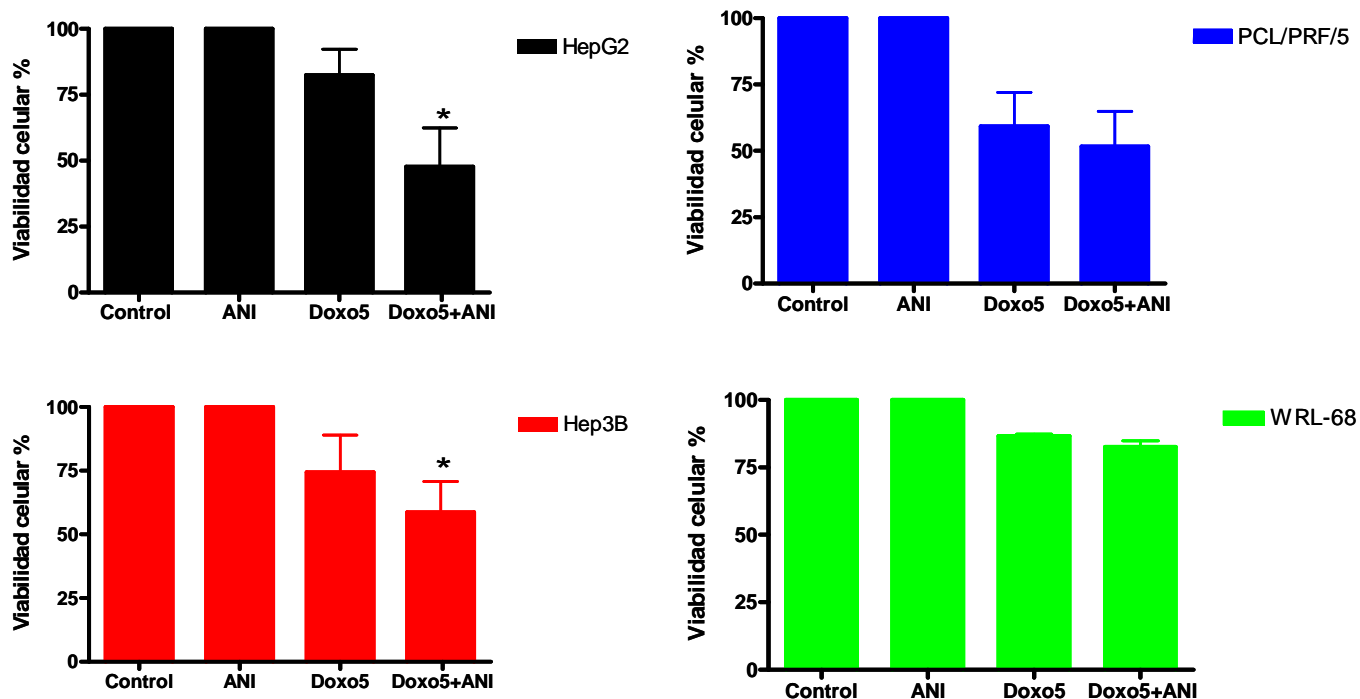
Posteriormente, se determinó la capacidad de la inhibición de PARP, de potenciar el efecto citotóxico de doxorubicina, en diferentes líneas celulares de CHC, a la dosis de 5 µg/ml. Las células tumorales de CHC HepG2, Hep3B y PCL/PRF/5 fueron tratadas con doxorubicina, en presencia o ausencia de ANI (10 µM), durante 48 horas. Se utilizó como control de células hepáticas no tumorales a la línea celular WRL-68, las cuales fueron sometidas al mismo tratamiento que las derivadas de Hepatocarcinoma. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. Los resultados obtenidos

muestran como la inhibición de la actividad enzimática de PARP, reduce significativamente la viabilidad de las células tumorales cuando son tratadas con doxorubicina. En las células HepG2, esta reducción es de 1.8 veces, en las Hep3B es de 1.3 veces, y en la PCL/PRF/5 es de 1.1 veces, comparando la viabilidad celular de las células tratadas con la terapia combinada del inhibidor y doxorubicina frente a tratadas sólo con doxorubicina. La pregunta que surge en este momento es si ANI es capaz de potenciar la muerte celular inducida por doxorubicina en las células no tumorales, ya que si es así, el tratamiento puede originar un incremento de efectos tóxicos secundarios indeseados. Interesantemente, el empleo de ANI (10 $\mu$ M) en la línea de hepatocitos no tumorales no produce ningún efecto potenciador de la toxicidad de doxorubicina (Figura 3), indicando que el tratamiento combinado con inhibidores de PARP puede ser de gran interés en la terapia del hepatocarcinoma.



**Figura 2: Efectos de los inhibidores de PARP-1 en la viabilidad de las HepG2 después del tratamiento con doxo.**

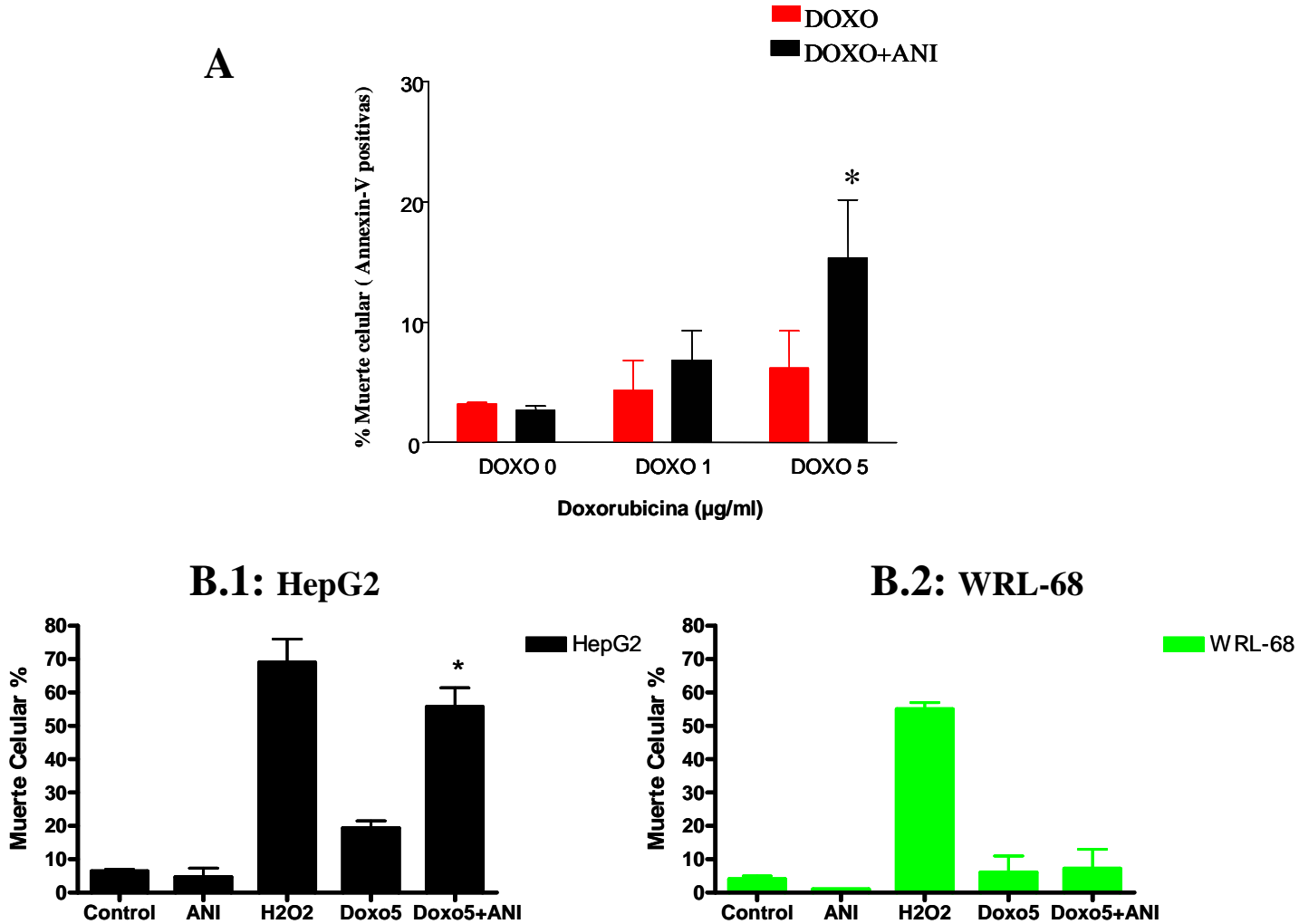
La viabilidad celular a corto plazo (48 horas) de las células HepG2 a dosis crecientes de doxo fue determinada por el ensayo del MTT. Las células pretratadas con ANI 10 $\mu$ M y tratadas con doxo a la concentración de 5  $\mu$ g/ml (en color rojo) disminuyen significativamente su viabilidad respecto a las tratadas sólo con la doxo (en color negro). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. \* $P \leq 0.05$  con respecto a células HepG2 tratadas con o sin ANI 10  $\mu$ M.



**Figura 3: Viabilidad celular de diferentes líneas celulares de CHC y una línea de hepatocitos no tumorales tratadas con doxorubicina en presencia o ausencia de ANI.** Mediante análisis de MTT, se demuestra como la terapia de inhibidor de PARP-1 y doxorubicina reduce la viabilidad de las células tumorales HepG2 (color negro), Hep3B (color rojo), PCL/PRF/5 (color azul) y no en las no tumorales WRL-68 (color verde). La disminución de la viabilidad celular resulta significativa en las células HepG2 y Hep3B. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. \* $P \leq 0.05$  con respecto a células tratadas con o sin ANI 10  $\mu\text{M}$ .

A continuación se realizaron ensayos de muerte celular tras el tratamiento con doxorubicina mediante citometría de flujo de anexina-V (marcador de muerte celular por apoptosis) en las células HepG2 y ensayos colorimétricos de trypan blue en las células tumorales y en las no tumorales. Los resultados obtenidos por anexina-V mediante el análisis de citometría muestran que la inhibición de PARP potencia el efecto citotóxico de la doxorubicina en las células HepG2 en una magnitud de 3 veces cuando se combina con ANI 10  $\mu\text{M}$  (figura 4.A). Así mismo, los resultados con trypan blue confirman los datos de citometría así como los de supervivencia celular, dichos resultados muestran que el pretratamiento con ANI resulta en una potenciación significativa de la muerte celular inducida por doxorubicina en las células HepG2 (Doxo

24% vs. Doxo+ANI 61%) (Figura 4.B.1), mientras que en las células WRL-68 este efecto no se observa (Doxo 20% vs. Doxo+ANI 21%) (Figura 4.B.2). Estos resultados muestran que la inhibición de PARP por ANI tiene un efecto tóxico en las células tumorales pero no en las normales.



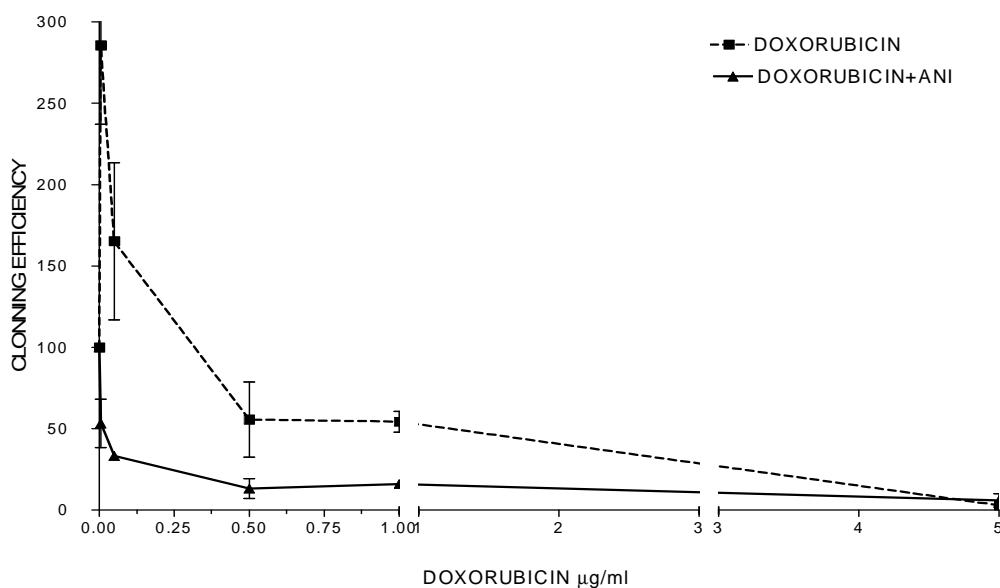
**Figura 4: Efectos de los inhibidores de PARP-1 en la muerte celular después del tratamiento con doxo.**

(A) Medida de anexina-V mediante análisis de citometría de flujo 48 horas después del tratamiento con doxo. La inhibición de PARP-1 con ANI 10 µM en las células HepG2 incrementan significativamente la muerte celular inducida por doxo a la dosis de 5 µg/ml (3 x). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. \* $P \leq 0.05$  con respecto a células HepG2 tratadas con o sin ANI 10 µM. (B.1 y B.2) Análisis de la muerte celular 48 horas después del tratamiento con 5 µg/ml de doxo en las células HepG2 (B.1) y en las WRL-68 (B.2), mediante el método de exclusión del trypan blue. El efecto citotóxico de la doxo se incrementa por la inhibición de PARP en 2.5 veces en las HepG2, mientras que en las WRL-68 no ocurre. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. \* $P \leq 0.05$  con respecto a células HepG2 tratadas con o sin ANI 10 µM.



### 1.4.3.- La inhibición de PARP sensibiliza a las células de CHC, HepG2, a la acción de doxorubicina en ensayos a largo plazo.

Para evaluar el efecto citotóxico del cotratamiento de doxorubicina y ANI en las HepG2 a largo plazo (20 días después del tratamiento) se realizaron ensayos de formación de colonias (colony forming assay, CFA). La citotoxicidad a largo plazo fue potenciada en las células tratadas con ANI 10  $\mu$ M. Este hecho se observa cuando comparamos la dosis letal o dosis a la cual la supervivencia celular se reduce al 50%. En las células HepG2 tratadas sólo con doxorubicina su  $DL_{50}$  se alcanza a la dosis de 1  $\mu$ g/ml, mientras que en las células tratadas con doxorubicina más ANI, su  $DL_{50}$  se alcanza a la dosis de 0'005  $\mu$ g/ml. Estos resultados tienen una gran importancia desde el punto de vista clínico ya que nos muestran que necesitamos una dosis 200 veces inferior de doxorubicina en el tratamiento combinado con ANI para que se produzca el mismo efecto citotóxico que en la monoterapia con doxorubicina, pudiéndose reducir considerablemente los efectos secundarios adversos que se producen por el uso de este fármaco antitumoral (figura 5).



**Figura 5: Ensayo de formación de colonias (CFA) en células HepG2 después de la incubación con diferentes dosis de doxo y con o sin ANI 10  $\mu$ M. El co-tratamiento con ANI potencia significativamente la citotoxicidad de doxo. Los valores de supervivencia representan la media de tres experimentos independientes y están normalizados por la eficiencia de formación de colonias de los controles no tratados. Las barras de error representan error estándar de la media (SEM).**

Los resultados obtenidos hasta el momento nos demuestran que la terapia combinada de doxorubicina y ANI puede ser eficaz en el tratamiento antitumoral frente al CHC, incrementando la muerte celular generada por el antitumoral así como permitiendo reducir la dosis de la doxorubicina y de este modo reducir los efectos adversos producidos por el uso de esta antraciclina.



## 1.5.- DISCUSIÓN

Las terapias antitumorales actuales generalmente resultan ser ineficaces debido a alta resistencia de las células tumorales frente a la muerte celular inducida por estas terapias. Además, el otro gran problema de la quimioterapia son los tremendos y devastadores efectos secundarios asociados a la administración sistémica de las drogas antitumorales. Por tanto, el objetivo de las nuevas terapias es encontrar dianas antitumorales adecuadas, capaces de potenciar la muerte celular de las células tumorales, aumentando el efecto citotóxico de los quimioterapéuticos existentes utilizados en clínica, sin necesidad de aumentar sus dosis, y a ser posible, esa muerte celular debe de ser de tipo apoptótico con el fin de evitar los efectos adversos secundarios, como la inflamación que se produce en la muerte celular por necrosis y la producción de estrés oxidativo, responsables del daño a los tejidos sanos.

La proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa, desde su descubrimiento hace 40 años hasta la actualidad, ha estado unida al estudio de la terapia antitumoral. Esta enzima nuclear se activa al detectar roturas en el ADN de cadena simple, principalmente, producidas por diferentes agentes genotóxicos, y es capaz de unirse a esas roturas permitiendo la reparación de la lesión. Este hecho constituye un efecto negativo de resistencia frente a la terapia antitumoral cuyo objetivo es producir daños en el ADN. Cuando el daño en el ADN es excesivo, la sobreactivación de PARP-1 produce una disminución de los niveles de  $\text{NAD}^+$  y ATP, generando un colapso energético y conduce a la célula a una muerte celular por necrosis. Por tanto, debido a la implicación de PARP-1 en los mecanismos de reconocimiento y reparación del ADN, además de su papel en la muerte celular, la inhibición química de PARP-1 mediante la utilización de inhibidores específicos, podría resolver el problema de la resistencia a las terapias antitumorales así como los efectos secundarios negativos asociados a una sobreactivación de dicha proteína. Numerosos trabajos asocian la inhibición de PARP-1 con un incremento de sensibilidad de las células tumorales frente a agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa I y de la radiación ionizante pero no se dispone de información concluyente acerca de su posible implicación positiva en la potenciación del efecto citotóxico con otros agentes antitumorales muy usados en clínica, como por ejemplo, los inhibidores de la topoisomerasa II (Bowman et al. 2001).

Entre las drogas antineoplásicas más utilizadas en la actualidad se encuentran las antraciclinas, que se aplican en el tratamiento de una gran variedad de tumores que afectan a los seres humanos. Las antraciclinas constituyen un grupo de antibióticos de origen bacteriano (derivados de *Streptomyces*), que están formadas por un núcleo químico de antraquinona unido a un aminoazúcar. Los dos miembros más representativos de las antraciclinas son la daunorubicina y la doxorubicina o adriamicina. A pesar de tener actividad antibacteriana, en la práctica clínica no se emplean con esta finalidad sino por su efecto citotóxico transitorio que las convierte en un fármaco antineoplásico eficaz. El clorohidrato de doxorubicina se genera por la bacteria *Streptomyces peuceticus o coeruleorubidus*. La doxorubicina se utiliza en el tratamiento de leucemias linfoblásticas y megaloblásticas agudas, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin y en tumores sólidos, como los sarcomas, cáncer de mama, tiroides, bronco-pulmonar, gástrico, hepatocarcinoma, ovario-endometrio, próstata, vejiga y testículo. De estos datos se deduce que las antraciclinas son los agentes antitumorales de mayor espectro y empleo en la oncología actual. La doxorubicina basa su efecto en la inducción de daños en el ADN mediante la inhibición de la topoisomerasa II (Gudkov et al. 1993). Los datos disponibles en bibliografía son confusos acerca de la activación de PARP-1 mediante el uso de inhibidores de la topoisomerasa II; de hecho, el principal representante de este grupo de inhibidores, el etopóxido, muestra que no existe relación entre este inhibidor de la topoisomerasa II y la activación de PARP-1. Sin embargo, compuestos de nueva generación, como el caso de C-1305, si manifiesta una relación entre PARP-1 y inhibidores de la topoisomerasa II (Wesierska-Gadek et al. 2004; Tentori and Graziani 2005). En nuestro estudio hemos encontrado una rápida activación de la síntesis de PAR [Polímero de Poli (ADP-ribosa)] que se produce tras el tratamiento con doxorubicina, mostrando la existencia de un efecto directo de dicha antraciclina sobre la activación de PARP (Figura 1).

Como se puede observar de los datos de  $DL_{50}$  obtenidos en los ensayos de formación de colonias y en el resto de ensayos de viabilidad y muerte celular que han sido recogidos a lo largo del presente capítulo, el tratamiento combinado con inhibidores de PARP sensibiliza a las células HepG2, Hep3B y PCL/PRF/5 a la muerte celular inducida por doxorubicina pero no a los hepatocitos no tumorales, WRL-68 (Figura 3). Como se ha comentado anteriormente, la capacidad de los inhibidores de PARP para potenciar la muerte celular inducida por agentes alquilantes y por la radiación ionizante ha sido ampliamente descrita (Virag and Szabo 2002; Miknyoczki et

al. 2003). Como resultado de estas investigaciones se están realizando los primeros ensayos clínicos que implican inhibidores de PARP combinados con temozolomida (potente agente alquilante) en el tratamiento del cáncer. Los datos que aquí se presentan constituyen la primera información acerca del potencial uso de inhibidores de PARP en el tratamiento combinado del hepatocarcinoma con el ampliamente utilizado agente antitumoral doxorubicina.

Del conocimiento obtenido hasta la fecha, se deduce que las potenciales ventajas del uso de inhibidores de PARP en la terapia antitumoral son principalmente dos: 1) el aumento de la eficacia de los agentes que producen daños en el ADN evitando el correcto funcionamiento de los mecanismos de reparación y 2) la protección de los tejidos normales no tumorales de los efectos tóxicos derivados del uso de la quimioterapia. En este sentido, el uso de las antraciclinas está limitado por sus efectos cardiotóxicos. La miocardiopatía tras tratamiento con doxorubicina puede manifestarse de manera inmediata o hasta más de 200 días después de la última dosis. No obstante, en la literatura médica existen datos sobre la presencia de enfermedad cardíaca en supervivientes a los padecimientos neoplásicos después de cinco años o más de finalizada la quimioterapia (Postma et al. 2002). Se ha demostrado que este efecto degenerativo se produce por estrés oxidativo en los cardiomiocitos (Weinstein et al. 2000; Tentori and Graziani 2005). El peróxido de oxígeno y peroxinitrito causan roturas en el ADN que desencadenan en una sobre-activación de PARP-1 produciéndose un alto consumo energético y muerte celular, descrita inicialmente como necrótica, sobre dichos tejidos (Virag et al. 2003; Virag 2005). El uso de inhibidores de PARP protege de los efectos cardiotóxicos producidos por doxorubicina, tanto a corto plazo, como de los efectos que aparecen tiempo después del cese del tratamiento, sin la reducción por ello del efecto sensibilizador de la citotoxicidad de esta antraciclina (Pacher et al. 2002; Szenczi et al. 2005). Otro ejemplo positivo ejercido por el uso de inhibidores de PARP lo constituye el efecto protector frente a la toxicidad de riñón originada por el uso del anti-neoplásico cisplatino, sin que la combinación de ambas moléculas afecte a su eficacia antitumoral (Racz et al. 2002).

Finalmente, se ha descrito que los inhibidores de PARP producen vasodilatación, aumentando el flujo sanguíneo al interior del tumor, generalmente poco vascularizado, facilitando con ello la penetración de los agentes antitumorales al foco del problema tumoral mejorando la eficacia del tratamiento. El mecanismo subyacente es todavía desconocido, pero se cree que los inhibidores actúan eliminando la

contracción de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos (Hirst et al. 1995; Ruddock et al. 2000). De esta forma, se puede mejorar la capacidad de difusión de doxorubicina al interior del tumor (Tannock et al. 2002).

Por tanto, de todos estos datos, podemos concluir que el uso de inhibidores de PARP, en combinación con doxorubicina, puede constituir una forma novedosa de terapia antitumoral frente al hepatocarcinoma, por los siguientes hechos concluyentes:

1. La inhibición de PARP-1 sensibiliza a las células de CHC a la acción citotóxica de la doxorubicina y no a las células no tumorales (Figura 3).
2. La doxorubicina en combinación con inhibidores de PARP-1 potencia significativamente la muerte celular de células tumorales de CHC y no de células no tumorales (Figura 4).
3. La terapia combinada de inhibidores de PARP-1 y doxorubicina a largo plazo, minimiza la expansión clonal de las células tumorales, potenciando espectacularmente la muerte celular inducida por doxorubicina (Figura 5).

## **BIBLIOGRAFÍA**





Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004; 26:882-893.

Beneke S, Diefenbach J, Burkle A. Poly(ADP-ribosyl)ation inhibitors: promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions. *Int J Cancer* 2004; 111:813-818.

Bowman KJ, Newell DR, Calvert AH, et al. Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *Br J Cancer* 2001; 84:106-112.

Calabrese CR, Almassy R, Barton S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:56-67.

Chenivesse X, Franco D, Brechot C. MDRI (multidrug resistance) gene expresión in human primary liver cancer and cirrosis. *J Hepatol* 1993; 18(2):168-172.

Curtin NJ. PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 2005; 7:1-20.

Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De Murcia J, et al. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 2000; 39:7559-7569.

de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:7303-7307.

Freshney, R. *Cultura of Animal Cells: A Manual Basic Technique*, p.117, Alan R.Liss, Inc., New York 1987.

Friedman MA. Primary hepatocellular cancer-present results and future prospects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983; 9(12):1841-1850.

Graziani G, Battaini F, Zhang J. PARP-1 inhibition to treat cancer, ischemia, inflammation. *Pharmacol Res* 2005; 52:1-4.

Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR, et al. Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3231-3235.

Hirst DG, Kennovin GD, Tozer GM, et al. The modification of blood flow in tumours and their supplying arteries by nicotinamide. *Acta Oncol* 1995; 34:397-400.

Lai CL, Wu PC, Chan GC, et al. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. *Cancer* 1988; 62(3):479-483.

Martín-Oliva D, Aquilar-Quesada R, O'Valle F, et al. Inhibition of Poly (ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expresión, including hipoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66(11): 5744-5756.

Miknyoczki SJ, Jones-Bolin S, Pritchard S, et al. Chemopotential of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2003; 2:371-382.

Muñoz-Gómez JA, Rodríguez-Vargas JM, Quiles-Pérez R, et al. Essential role of PARP-1 in autophagy induced by chemotherapy. *Autophagy* 2008, en prensa.

Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D, Aguilar Quesada R, et al. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J.*, 2005; 386:119-125.

Noel G, Godon C, Fernet M, et al. Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:564-574.

Nowak AK, Chow PK, Findlay M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. *Eur J Cancer* 2004; 40(10):1474-1484.

Pacher P, Liaudet L, Bai P, et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:862-867.

Pacher P, Liaudet L, Bai P, et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:862-867.

Postma A, Elzenga NJ, Haaksma J, et al. Cardiac status in bone tumor survivors up to nearly 19 years after treatment with doxorubicin: a longitudinal study. *Med Pediatr Oncol* 2002; 39:86-92.

Racz I, Tory K, Gallyas F, et al. BGP-15 - a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor - protects against nephrotoxicity of cisplatin without compromising its antitumor activity. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:1099-1111.

Racz I, Tory K, Gallyas F, et al. BGP-15 - a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor - protects against nephrotoxicity of cisplatin without compromising its antitumor activity. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:1099-1111.

Ruddock MW, Burns DM, Murphy LE, et al. The effect of nicotinamide on spontaneous and induced activity in smooth and skeletal muscle. *Radiother Oncol* 2000; 56:253-257.

Schlicker A, Peschke P, Burkle A, et al. 4-Amino-1,8-naphthalimide: a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase and radiation sensitizer. *Int J Radiat Biol* 1999; 75:91-100.

Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 2000; 460:1-15.

Smith LM, Willmore E, Austin CA, et al. The novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8449-8457.

Szenczi O, Kemecei P, Holthuijsen MF, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:725-732.

Szenczi O, Kemecei P, Holthuijsen MF, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:725-732.

Tannock IF, Lee CM, Tunggai JK, et al. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8:878-884.

Tentori L, Graziani G. Chemopotential by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Res* 2005; 52:25-33.

Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:375-429.

Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 2000; 140-141:113-124.

Virag L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3:209-214.

Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294:396-401.

Wesierska-Gadek J, Schloffer D, Gueorguieva M, et al. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout cells to antitumor triazoloacridone C-1305 is associated with permanent G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004; 64:4487-4497.



**CAPÍTULO II:**

**LA INHIBICIÓN QUÍMICA DE PARP-1 CONFIERE  
RESISTENCIA A LA HEPATOCARCINOGENÉISIS EN UN  
MODELO DE RATONES PARP-1 PARENTALES.**





## 2.1.- RESUMEN.

La cirrosis hepática representa el mayor factor de riesgo clínico de desarrollo de CHC, entre el 70-90% de los CHC aparecen en hígados cirróticos. La cirrosis es el resultado final de la inflamación crónica que caracteriza a ciertas enfermedades hepáticas, como las hepatitis crónicas producidas por el virus B y C. En estas patologías, el daño crónico y regeneración hepática ocurre en un contexto de inflamación, respuesta inmune y daño oxidativo del ADN, que conduce a una cirrosis y posterior transformación maligna de los hepatocitos. La inhibición de la respuesta inflamatoria frente al daño hepático crónico puede ser utilizada como una terapia preventiva en los pacientes cirróticos retardando su progresión tumoral. El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción responsable de la respuesta inflamatoria asociada al desarrollo tumoral en enfermedades inflamatorias crónicas y cuya activación transcripcional depende de la actividad enzimática de PARP-1. En este trabajo, hemos analizado la inhibición química de PARP-1 in vivo como una nueva diana para prevenir la aparición de CHC en las cirrosis instauradas, debido a la interacción entre PARP-1, NF- $\kappa$ B e inflamación características de las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis. Mediante este estudio, en un modelo de ratones normales sometidos a un protocolo de inducción tumoral con el carcinógeno hepático N, N-dietilnitrosamina, hemos podido demostrar que el tratamiento con el inhibidor de PARP-1, DPQ, disminuye significativamente la proliferación de los hepatocitos de los ratones tratados con DPQ comparados con los no tratados (22.2 vs 32.5,  $P \leq 0.01$ ). El estudio de los niveles de activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B han demostrado que los ratones tratados con el inhibidor DPQ presentan una activación significativamente menor que los ratones no tratados (161.1 vs 267.52,  $P \leq 0.01$ ). Mediante PCR en tiempo real hemos analizado los niveles de expresión de determinados marcadores tumorales de CHC. En los ratones tratados con DPQ los niveles de expresión génica de GST o glutatión transferasa, VEGF o factor de crecimiento vascular y OPN o osteopontina se encuentran reprimidos comparados con los ratones no tratados (1.74 vs 9.85, para GST; 2.64 vs 8, para VEGF y 1.52 vs 11.31, para OPN). En resumen, los resultados obtenidos indican que la inhibición de PARP dificultaría la progresión a CHC debido a una deficiente activación de NF- $\kappa$ B

y disminución de la expresión de genes relacionados con la progresión tumoral, además de inhibir la proliferación celular.

## 2.2.- INTRODUCCIÓN.

El CHC es uno de los tumores más comunes del mundo. Su gran variedad de factores etiológicos hacen que los CHC sean fenotípica y genéticamente muy heterogéneos, aunque comúnmente parten de un trasfondo de enfermedad hepática crónica. La hepatitis crónica, por el virus B o C, toxinas como el alcohol o la aflatoxina, las enfermedades metabólicas del hígado o la enfermedad del hígado graso no alcohólica son algunos de los factores etiológicos que actúan a través de los caminos de daño hepático crónico, regeneración y cirrosis. La cirrosis es considerada el mayor factor de riesgo, debido a que entre el 70-90% de los CHC aparecen en un hígado cirrótico. Los pacientes con hepatitis crónicas del virus B o C que finalmente desarrollan cirrosis son los de mayor riesgo de padecer un CHC (Hubert E.B, 2005). El daño hepático que se produce en las hepatitis virales es debido a la inflamación crónica que cursa a lo largo de estas patologías. Numerosos estudios señalan a la activación constitutiva del factor de transcripción NF- $\kappa$ B como un evento crucial de las fases tempranas de la oncogénesis hepática (Arsura&Cavin, 2005). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que en condiciones de reposo se localiza en el citoplasma celular unido a sus proteínas inhibitoras kappa  $\beta$  (I $\kappa$ B). En respuesta a una gran variedad de estímulos, incluyendo las infecciones virales, citokinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, la proteína inhibidora I $\kappa$ B será fosforilada y degradada en el proteosoma, quedando el NF- $\kappa$ B libre en el citoplasma, y será translocado al núcleo celular donde activará la expresión génica (Arsura&Cavin, 2005; Luo et al, 2005). El NF- $\kappa$ B induce la expresión de genes que inhiben tanto la muerte celular apoptótica y necrótica, representando un mecanismo general de defensa frente al daño hepatocelular de diferente etiología. Sin embargo, si su activación persiste durante las fases preneoplásicas pueden conferir una avanzada supervivencia a los hepatocitos que hayan adquirido mutaciones oncogénicas, favoreciendo la promoción tumoral (Pikarski et al, 2004). Este mecanismo podría establecer la relación entre inflamación y tumorogénesis. De acuerdo a estos datos, la inhibición del NF- $\kappa$ B podría ser utilizada como terapia y prevención del CHC.

Numerosos trabajos anteriores, han descrito una nueva función de la proteína PARP-1 como co-activador transcripcional del factor de transcripción NF- $\kappa$ B

(Oliver et al, 1999; Hassa y Hottiger, 1999; Hassa et al, 2001). Estos resultados han demostrado que PARP-1 es necesaria para la activación de NF- $\kappa$ B. La ausencia de PARP-1 permite la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo celular pero impide su unión a las secuencias promotoras de los genes regulados por este factor de transcripción.

El desarrollo de ratones PARP-1 knockout ha permitido demostrar que estos ratones son menos sensibles al estrés inflamatorio debido a la inactivación del factor NF- $\kappa$ B y por tanto ausencia de liberación de mediadores pro-inflamatorios (Oliver et al, 1999). La capacidad limitada que presentan los ratones PARP-1 knockout para activar el factor NF- $\kappa$ B podría ser un factor de protección o enlentecimiento en el desarrollo tumoral. Cada vez son más los estudios que relacionan una desregulación del factor NF- $\kappa$ B con numerosas patologías, entre ellas, con procesos tumorales (Bharti y Aggarwal, 2002; Gilmore et al, 2002). Además, en el caso de las hepatitis crónicas virales, tanto el virus B como el C, pueden activar el NF- $\kappa$ B, y de este modo modular la apoptosis celular, asociándose con la oncogénesis (Hilda E et al, 1996; Tai DI et al, 2000). Determinados estudios han demostrado que la activación constitutiva del NF- $\kappa$ B se encuentra más frecuentemente en tejido tumoral de CHC comparado con tejido no tumoral, jugando un papel en la hepatocarcinogénesis por infección del virus B o C, la sobreactivación del NF- $\kappa$ B acompañada de una desregulación de su proteína inhibidora (Tai DI et al, 2000).

Basándonos en estos estudios, la inhibición química de PARP-1 in vivo se presenta como una nueva diana para prevenir la aparición de CHC en las cirrosis instauradas, debido a la interacción entre PARP-1, NF- $\kappa$ B e inflamación características de las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis. Un grupo de ratones PARP-1 parentales han sido sometidos a un protocolo de inducción tumoral con el carcinógeno hepático N, N-dietilnitrosamina. Posteriormente, un grupo de ratones ha sido tratado semanalmente durante 12 semanas con el inhibidor específico de PARP-1, el 3,4-dihidro-5-[4-(piperidiny)butoxyl-1(2H)isoquinolinon3] o DPQ (Alexis Biochemicals). Los resultados muestran que PARP-1 modula la progresión tumoral, a través de su capacidad de regular la activación NF- $\kappa$ B, la proliferación celular de los hepatocitos, y la expresión de determinados marcadores tumorales que conducirían a la aparición de CHC. Los ratones tratados con el inhibidor DPQ presentan resultados indicativos de un retraso en la iniciación tumoral con un descenso en la tasa de proliferación, menor activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y unos niveles reprimidos de expresión de marcadores tumorales.

## **2.3.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **2.3.1.- Protocolo de inducción química tumoral.**

Ratones *parp-1+/+* de fondo genético C57BL/6 fueron generados por recombinación homóloga en el laboratorio de Gilbert de Murcia (Menissier-de Murcia et al, 1997). Un total de 30 ratones fue sometido a un protocolo de inducción tumoral, utilizando el agente químico inductor de carcinogénesis hepática, el N,N-dietilnitrosamina o DEN (Sigma) (Goldfarb S et al, 1995). A los ratones, de aproximadamente 2 semanas de edad, se les administró una única inyección i.p de DEN a una concentración de 5 µg/g peso animal. Transcurrida una semana, un grupo de ratones (N=10) fue tratado semanalmente mediante inyección i.p con el inhibidor específico de PARP-1, DPQ o 3,4-dihydro-5-[4-(piperidinyl)butoxyl-1(2H)isoquinolinon3] (ALEXIS BIOCHEMICALS), a una concentración de 5 µg/g peso animal (DPQ 25 µg/µl) durante un tiempo total de 12 semanas. Los ratones del grupo control (N=10) y los ratones del grupo tratado con DEN pero no con DPQ (N=10), fueron tratados semanalmente con una inyección i.p de suero fisiológico. Todos los ratones fueron sacrificados a las 12 semanas.

### **2.3.2.- Medidas de proliferación celular.**

Mediante ensayos de incorporación de la bromodesoxiuridina (BrdU), análogo de la timidina, se determinó la proliferación de los hepatocitos en las fases iniciales de la carcinogénesis. A todos los ratones se les proporcionó, 24 horas antes de ser sacrificados (de acuerdo con los métodos del Servicio de Animalario del CSIC, Granada), una inyección i.p de BrdU (200 mg/Kg peso animal de BrdU, Sigma; en 1% NaCl). Posteriormente, los hígados extraídos se fijaron en solución de Carnoy's, compuesta por cloroformo, ácido acético y etanol en proporciones de 3:1:6 respectivamente, a 4° C toda la noche, deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol y luego embebidas en parafina, seccionadas a 5 µm y marcadas para técnicas de inmunofluorescencia indirecta, usando un anticuerpo monoclonal frente a la BrdU (Sigma, clone BU-33) según protocolo (Wang et al, 1999). Para ello los cortes histológicos adheridos sobre los portaobjetos fueron deshidratados en baños

de 5 minutos con concentraciones crecientes de alcohol. Posteriormente fueron desparafinados mediante dos baños de xilol de 15 minutos y de nuevo hidratados en concentraciones crecientes de alcohol hasta pasar por agua destilada. A continuación se realiza la despolarización del ADN mediante incubación de los cortes en HCl 4N durante 10 minutos, seguido de varios lavados con PBS tween al 0'1%. Para permeabilizar los tejidos, los cortes se incubaron 10 minutos en 0'2% Tritón X-100 en PBS tween al 0'1% durante 10 minutos, lavados 2 veces con PBS tween al 0'1% seguido de una etapa de saturación de los sitios no específicos, mediante incubación de los cortes en suero de cabra (NGS) al 10% diluido en PBS tween al 0'1% (NGS 1:30, Sigma) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se secaron los cortes y se incubaron toda la noche en una cámara húmeda, a 4°C con el anticuerpo primario anti-BrdU diluido 1:50 en PBS tween al 0'1% conteniendo un 1% de BSA (albúmina sérica bovina, Sigma) y un 5% de NGS. Al día siguiente se lavaron los cortes 3 veces con PBS tween al 0'1% y seguidamente se incubaron 1 hora en oscuridad con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC), diluido 1:200 en PBS tween al 0'1% conteniendo un 1% de BSA y un 5% de NGS. Transcurrido el tiempo de incubación, los cortes son nuevamente lavados en PBS tween al 0'1% y finalmente se procedió a teñir los núcleos con Ioduro de propidio (0'5-1 µg/ml, Sigma) durante 10 minutos en oscuridad, seguido de lavados finales y montaje con cubreobjetos y una solución protectora de fluorescencia (Vectashield; Vector laboratorios). Para cuantificar el número de núcleos positivos para BrdU (células que proliferan) en los cortes de hígado, varios campos por sección a aumentos de 400X tomados al azar fueron capturados y digitalizados con un microscopio confocal Leica TCS SP, calculándose de esta forma el porcentaje de núcleos BrdU-positivos. Se utilizaron tres ratones por cada condición de estudio (controles, tratados con DEN y tratados con DEN+DPQ).

### **2.3.3.- Estudios de activación de NF-κB**

Se realizarán geles de retardo o EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) para comprobar la trans-activación de NF-κB al núcleo celular. Para ello se utilizarán oligonucleótidos con la secuencia de unión para NF-κB en el promotor del gen iNOS (5'-TGCTAGGGGGATTTCCCTCTTCTTGT-3'-sentido y 5'-ACAAGAAGAGGGAAAATCCCCCTAGCA-3'-antisentido) marcados con [ $\gamma^{32}$ -P]

ATP utilizando la enzima polinucleótido kinasa T4 (Xie et al, 1994). Para ello se preparó a 4°C la reacción de marcaje radiactivo para cada uno de los oligos, de tal modo que cada mezcla de reacción contuviese 1 µl de oligo, 1 µl de tampón de fosforilación 10X (Roche), 4.5 µl de agua destilada, 2.5 µl de [ $\gamma^{32}$ -P] ATP y 1 µl de la enzima polinucleótido quinasa (10U/µl; Roche). Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C. Transcurrida esta incubación, se añadió a una de las muestras 90 µl de agua destilada y se mezcló con el contenido de la otra. La mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos, y se dejó enfriar durante 2 horas a temperatura ambiente para lograr la hibridación de los oligos marcados. El resultado de esta reacción constituye la sonda marcada. Para extraer y purificar la sonda, se añadió ésta a una columna de Sephadex G25 (Amersham), la cual se centrifugó a 2.500 r.p.m durante 3 minutos. Un microlitro del eluyente resultante (sonda marcada) fue introducido en viales de centelleos conteniendo 2 ml de solución de centelleo (Ecoscint<sup>TM</sup> H) para la medida del índice de radiactividad de la muestra, utilizando para ello un contador de centelleo líquido LKB 1209 RackBeta.

Los extractos nucleares de los hepatocitos de los hígados procedentes de los ratones control, tratados con DEN y tratados con DEN y DPQ se obtuvieron siguiendo protocolo de trabajos anteriores (Velasco M. et al, 1997). 180 ng de proteínas de los extractos nucleares se incubaran con 2 µl de sonda  $^{32}$ P-radiactiva (6 x 10<sup>4</sup> d.p.m) en un volumen final de 20 µl de reacción durante 15 minutos a 4°C de temperatura (Oliver et al, 1999). Cada tubo de reacción contenía los siguientes componentes: 5 µl de tampón de ensayo 4X (20% glicerol, 4mM EDTA, 0.4 M KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris-HCl pH 7.8 y 4 mM DTT), 1 µg de BSA, 1 µg de poli (dl-dC) (Roche), proteínas de los extractos nucleares, 60.000 d.p.m de sonda marcada, completando con agua destilada hasta un volumen final de 20 µl. Los complejos DNA-proteína (DNA- NF-κB) fueron separados en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5% en 0.5X de tampón EDTA Tris-borato (1,65 ml bis/acrilamida 29:1 al 30%, Bio-Rad; 1 ml de glicerol, Sigma; 50 µl de persulfato amónico al 10%, Bio-Rad; 48 µl TEMED, Bio-Rad; 7,252 ml de tampón EDTA Tris-borato 0.5X) durante 2 horas a un voltaje de 100 voltios en hielo. Finalmente fueron secados y visualizados por impresión en placas fotográficas tras una exposición de 24 horas. Un experimento de competición usando un exceso de diez veces de la sonda no marcada (sonda fría) con respecto a las sondas  $^{32}$ P-



radiactiva fue llevado a cabo para comprobar que las señales obtenidas anteriormente eran específicas.

#### **2.3.4.- Obtención de los extractos nucleares.**

Los hígados de ratón conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron disgregados de forma mecánica en un homogenizador o dounzer (Áfora), en hielo, para romper las membranas plasmáticas dando 15 pulsos de homogenización. Posteriormente el homogenizado recuperado se trató con detergente Igepal (Sigma) a una concentración final de 0.5% y se agitó de forma vigorosa durante 15 segundos, tras los cuales, la mezcla fue incubada durante 10 minutos en hielo. A continuación, los tubos son centrifugados a 13.000 r.p.m durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante correspondió a la fracción citosólica, la cual fue guardada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , mientras que el precipitado fue resuspendido en 50  $\mu\text{l}$  de tampón A (10 mM HEPES, pH 7.9, Sigma; 1 mM EDTA, Merck; 1 mM EGTA, Sigma; 10 mM KCl, Merck; 1 mM DTT, Sigma; 1 mM PMSF, Sigma; y cóctel de inhibidores de proteasas, Roche, de tal forma que una tableta era añadida a un volumen de 10 ml de tampón) conteniendo 20% de glicerol y 0.4 M de KCl. La fracción resuspendida fue mezclada en un agitador orbital-vertical durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por último la mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción nuclear de proteínas (Velasco et al, 1997). La concentración de proteínas de los extractos nucleares se determinó por el método colorimétrico de Bradford de forma similar a la descrita en la sección de materiales y métodos del capítulo I (página 90).

#### **2.3.5.- Expresión de genes inducidos durante CHC mediante RT-PCR:**

##### **2.3.5.1- Extracción y cuantificación del ARN total.**

El ARN total de los hígados conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  fue aislado mediante el protocolo de extracción de ARN basado en Trizol (Gibco). Los hígados fueron disgregados usando un bisturí y se resuspendieron en 1 ml de trizol. Trás un tiempo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente se les añadió 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo (Merck) a la mezcla, se agitó vigorosamente 15 segundos en vortex y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugan a 13.000 r.p.m durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recoge la fase acuosa

utilizando una micropipeta y se pasa a un nuevo tubo eppendorf. Se añade a continuación 0'5 ml de isopropanol (Sigma) y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga de nuevo la mezcla a 13.000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se elimina y el precipitado de ARN se lava con 1 ml de etanol al 75%. Para efectuar el lavado se agitan en vortex y se centrifugan a 7.500 r.p.m durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante es de nuevo eliminado y el precipitado de ARN se seca al aire para ser posteriormente resuspendido en 20 µl de agua milliQ y se dejan incuban 10 minutos a 55-60 °C. De cada muestra se recogen 0.5 µl de ARN (dilución 1:200) para su cuantificación en el espectrofotómetro (Eppendorf). El resto se conserva a -80°C hasta su utilización. La concentración de ARN se calculó sabiendo que una unidad de absorbancia medida a 260nm equivales a 40µg/ml de muestra. Para determinar el grado de pureza de las muestras también se obtuvo la relación entre absorbancia a 260 y 280nm (ABS260/ABS280).

#### **2.3.5.2.- Reacción de transcripción inversa.**

Una vez extraído y cuantificada la concentración del ARN total, se procedió sobre 2 µg de ARN la reacción de transcripción inversa en ADN complementario (ADNc) por RT-PCR utilizando el kit “iScript™cDNA Síntesis Kit” (Bio-Rad), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Este kit contiene los oligos: d(T)16, hexámeros aleatorios como cebadores y la enzima MMLV (Molones Murine Leucemia Virus, reverse transcriptase) como transcriptasa inversa. La transcripción inversa se llevó a cabo usando el programa térmico definido por el fabricante consistente en: incubación a 25°C durante 5 minutos (fase de preincubación), 45°C durante 30 minutos (fase de transcripción inversa), 85°C durante 5 minutos (fase de inactivación del enzima) y refrigeración a 4°C.

#### **2.3.5.3.- Reacción de PCR a tiempo real.**

Posteriormente se procedió al estudio de la expresión de varios genes que aumentan su expresión durante la hepatocarcinogénesis (glutación-S-transferasa, osteopontina y VEGF) (Hokaiwado N. y col. 2003).

La reacción de qRT-PCR se llevó a cabo en el termociclador Mx 3000P (Stratagene) usando el kit “QuantiMix EASY SYG” (Biotools), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit contiene el agente intercalante SYBR Green

específico de ADN de doble cadena que se une al ADN inmediatamente después de ser sintetizado y emite luz fluorescente tras estimulación (absorbancia a 497 nm y emisión a 520 nm). La emisión se recoge por el sistema detector del equipo en cada uno de los ciclos de la PCR. La fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN formado lo que nos permite conocer y registrar en todo momento la cantidad de ADN formado en cada ciclo de amplificación (Wittwer et al. 1997). El ciclo de la PCR en el que empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN que presenta la muestra, es decir, más cantidad de ADN inicial, menor valor de Ct. Por tanto, comparando los Ct de las distintas muestras a ensayar se puede calcular el incremento de expresión génica de una determinada muestra respecto a una condición control.

Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es relativamente fácil. El principal inconveniente del SYBR es su baja especificidad, debido a que se une de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores frecuentes en la PCR. Por ello y para detectar posibles errores de amplificación de productos no deseados o cuantificación de dímeros de cebadores, el sistema de PCR en tiempo real Mx 3000P (Stratagene) posee un sistema de análisis denominado "Meeting Point" o curva de desnaturalización por calor, sistema muy útil para interpretar los resultados con el fin de asegurar la especificidad de los mismos (Ririe et al. 1997). En este análisis, las curvas de desnaturalización por calor correctas muestran un solo pico definido a temperaturas superiores a 81.5°C. Sin embargo, cuando se amplifican productos no deseados o se forman dímeros de cebadores, se observan picos secundarios, a temperaturas inferiores de 81°C (correspondientes a dímeros de cebadores) o superiores a esta (productos indeseados), los cuales son detectados y contribuyen al valor de las Ct de tal forma que los resultados son analizados de forma inadecuada al sobrevalorar el Ct real. Para validar los resultados obtenidos, también se realizaron curvas patrón con diferentes concentraciones de ADN, destinadas a comprobar el efecto de duplicación del ADN en cada ciclo de la PCR, independientemente de la concentración del ADN utilizada, de tal modo que esta recta patrón obtenida con diluciones seriadas debe tener un coeficiente de correlación  $> 0.98$  y una pendiente cuyo valor oscile entre  $(3.2 - 3.4) \pm (0.1)$ , además de una eficiencia de PCR próxima al 100%. Para evitar estas

inespecificidades también es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas.

Una vez obtenido el ADNc, como se detalla en el apartado anterior, se procedió a la realización de la PCR en tiempo real utilizando el “Kit QuantiMix EASY SYG” (Biotools), anteriormente mencionado. Cada reacción de qRT-PCR (con un volumen final de 20  $\mu$ l) se realizó por triplicado y utilizando para cada una 10  $\mu$ l de reactivo “QuantiMix EASY SYG” (Biotools), 0.5  $\mu$ M de cada uno de los cebadores tanto sentido como antisentido, 1  $\mu$ l de ADNc y agua milliQ estéril hasta completar 20  $\mu$ l de reacción. La secuencia de los cebadores específicos para los genes a estudiar se resume en la tabla I. El control negativo de la reacción de amplificación lo constituyeron otra serie de reacciones que incluyen 1  $\mu$ l de agua milliQ estéril en lugar de ADNc. Para verificar que la cantidad de luz que llega al detector proviene de un solo producto, todas las reacciones se sometieron al protocolo de disociación por calor después del último ciclo (30-40 ciclos) de la qRT-PCR (Ririe et al. 1997). El perfil térmico utilizado para cada reacción de PCR fue el preestablecido en el software MxPro-Mx 3000P v.3.00 (Stratagene), con la salvedad de que la temperatura utilizada para la etapa de hibridación de la PCR correspondiente a las temperaturas óptimas de hibridación de cada uno de los cebadores utilizados, las cuales se pusieron a punto utilizando diferentes temperaturas y observando en cual de ellas se producía un menor valor del Ct, una curva de amplificación máxima, junto a una óptima curva de desnaturalización. La detección directa de los productos de PCR se monitorizó midiendo el incremento en la fluorescencia causada por la unión del colorante SYBR Green al ADN de cadena doble y calculando el valor Ct correspondiente a cada una de las muestras (Wittwer et al. 1997). Todas las muestras se normalizaron con respecto a un gen de referencia usado como control interno. El gen de referencia seleccionado fue el 18S ARNr (Burbach et al. 2003). La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando el método comparativo previamente descrito de las Ct (Wang et al. 2002; Zhu et al. 2004; Qian et al. 2005):  $n^{\circ}$  veces de inducción =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  muestra problema -  $\Delta Ct$  muestra control para un determinado gen de interés. Donde,  $\Delta Ct$  muestra problema es el valor de la Ct de la muestra problema para un determinado gen normalizado y  $\Delta Ct$  muestra control es el valor de la Ct de la muestra control sin tratar para ese mismo gen también normalizado según la expresión del gen de

referencia 18S ARNr. Para la validación del cálculo del  $\Delta\Delta Ct$  es necesario que las curvas patrón, tanto del gen de referencia como del gen a estudiar, cumpla los requisitos de eficiencia de PCR y coeficiente de correlación descritos anteriormente.

Además, con el objetivo de comprobar que el producto amplificado presenta el tamaño descrito en bibliografía y dilucidar si el producto de la PCR es un único compuesto, el producto resultante de la reacción de PCR se analizó por electroforesis de gel de agarosa, obteniéndose para todos los casos estudiados resultados positivos.

**Tabla I: Secuencia de cebadores usados para estudios de expresión génica por PCR en tiempo real**

Oligo	Secuencia (5'→3')	Tamaño frag	Ref./UniSTS number <sup>A</sup>
GstM3- Sense GstM3- Antisense	GGAGGGCCGTCACCTAAGATA ACAGCCCTTTTCTGCAATCT	135pb	165288
OPN-Sense OPN-Antisense	TGTGTCCTCTGAAGAAAAGGATGAC TCTGTGGCATCAGGATACGTTCA	350pb	Leani et al, 2003
VEGF-Sense VEGF-Antisense	TTCAGAGCGGAGAAAAGCATT GAGGAGGCTCCTTCCTGC	166pb	144751
18S rARN-Sense 18SrARN-Antisense	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA GCT GGA ATT ACC GCG GCT	181pb	Burbach et al, 2003

<sup>A</sup>UniSTS es una base de datos de secuencias de ADN correspondiente a diferentes genes (sequence tagget sites, STSs). Estas STSs han sido descritas por PCR usando parejas de cebadores definidos en esta base de datos con una identificación correcta (UniSTS number).

**Tabla I.- Secuencia de los cebadores utilizados para el estudio de expresión génica por PCR en tiempo real.** La secuencia fue obtenida de publicaciones científicas o de las descritas en la página web del pubmed en el aparatado de UniSTS publicado en la información disponible sobre genes. (S) sentido, (A) anti-sentido.

### 2.3.6.- Estudios histológicos

Los fragmentos de hígado se fijaron en formalina tamponada y se incluyeron en parafina. De cada bloque se han efectuado cortes de 4 micras que han sido teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) y reticulina. Además se han realizado técnicas inmunohistoquímicas (inmunoperoxidasa) para detección de glutation-S-transferasa, isoforma placentaria ( GSTp), y el índice de proliferación celular (ki67), utilizando anticuerpos de tipo policlonal, anti-GSTp (dilución 1/ 1000 ; control positivo: tejido tiroideo humano, Iddamaldeniya et al, 2003), y monoclonal, Mib1 (prediluido), respectivamente.

De cada ratón se ha realizado un recuento del nº de lesiones presentes en 8 campos, con un aumento intermedio (objetivo de 10x).

### **2.3.7.- Análisis estadístico.**

Para los análisis realizados se ha aplicado un test t de Student, considerándose diferencias significativas todas aquellas en las que se obtenían valores de  $P < 0.05$ .

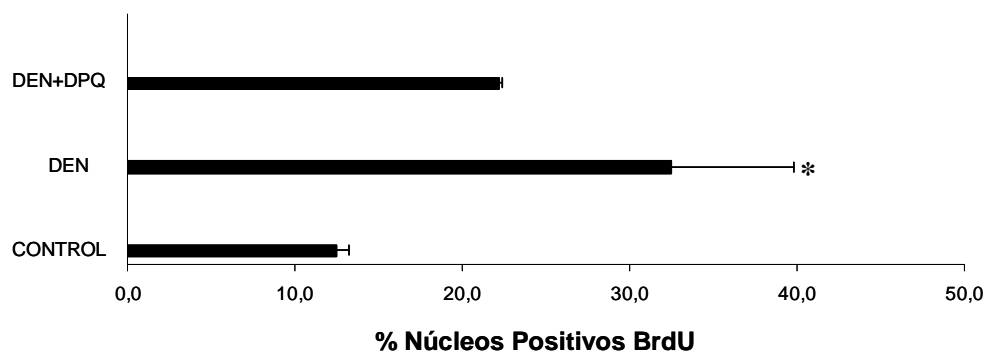


## 2.4.- RESULTADOS.

### 2.4.1.- La inhibición de PARP-1 disminuye la proliferación de los hepatocitos en las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis.

El estudio de proliferación de los hepatocitos de los hígados extraídos de los ratones C57BL6 sometidos a la inducción tumoral con el carcinógeno hepático DEN, tratados y no tratados con DPQ, y del grupo de ratones control, fue realizado mediante la aplicación de la técnica de incorporación de la BrdU, como se detalla en el apartado de materiales y métodos de este capítulo II (página 117).

Los resultados obtenidos muestran como la inhibición de PARP-1 disminuye significativamente la tasa de proliferación celular en los hepatocitos de los ratones tratados con DPQ semanalmente a la concentración de 5  $\mu\text{g/g}$  peso animal respecto a los no tratados ( $P \leq 0.01$ ). En los ratones sometidos sólo a la inyección i.p del carcinógeno hepático, el 32.5% de los hepatocitos aparecían marcados con BrdU, mientras que sólo el 22.2% de los hepatocitos procedentes de los hígados de los ratones tratados con DPQ incorporaban BrdU. En los ratones control, no sometidos al carcinógeno químico ni al DPQ, presentaban un 12.5% de hepatocitos marcados con BrdU (Figura 1).





---

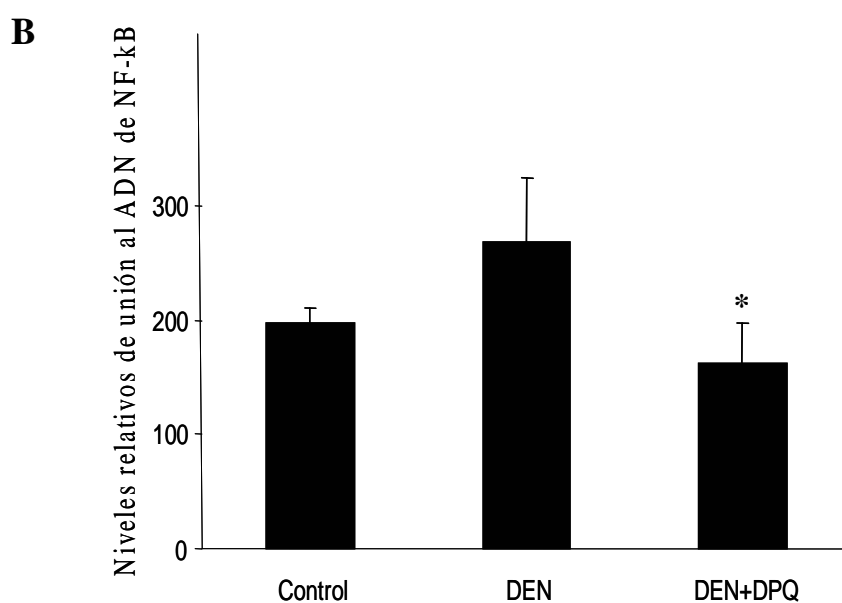
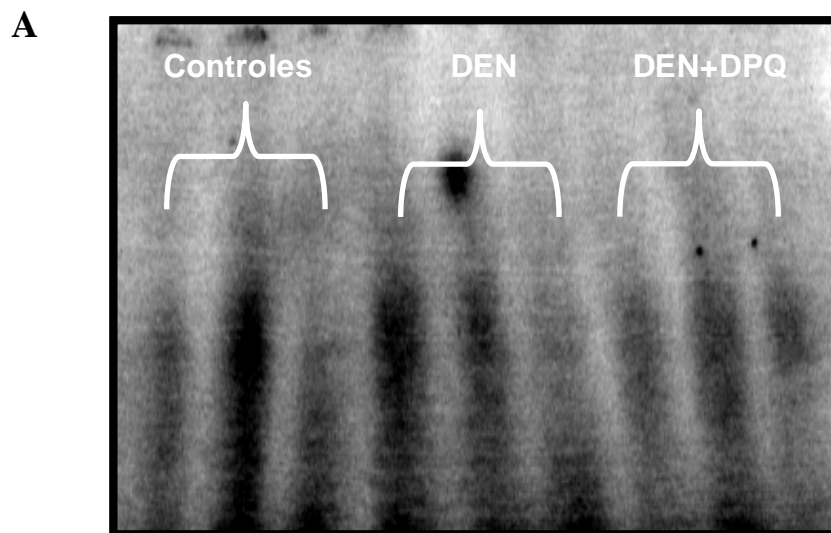
**Figura 1.- Proliferación celular: % Células Positivas Para BrdU.** Histograma que muestra las medidas de incorporación de BrdU contabilizadas como la medida del número de núcleos positivos para BrdU realizados en tres experimentos independientes para cada condición. Obsérvese que los hepatocitos de los ratones sometidos a terapia con el inhibidor de PARP-1 DPQ tras la inducción de hepatocarcinogénesis con el carcinógeno hepático DEN presentan una proliferación significativamente menor que los ratones no tratados con el DPQ. Las barras de error representan el error estándar de las medias (S.E.M) correspondientes a tres experimentos independientes. \* $P \leq 0.01$  con respecto a los ratones tratados con DPQ.

---

#### **2.4.2.- La inhibición de PARP-1 provoca una disminución de la inflamación en las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis debido a una activación deficiente de NF-kB.**

La función de PARP-1 como co-activador transcripcional del factor de transcripción NF-kB, y la implicación de este factor en la inflamación y en la progresión tumoral, hacen que los inhibidores de PARP-1 sean una diana para evitar indirectamente la activación de NF-kB y prevenir los daños colaterales de la inflamación crónica, hecho que ocurre en las hepatitis virales. Por ello, hemos estudiado los niveles de activación de NF-kB en el modelo de ratones sometidos a inducción tumoral con el carcinógeno hepático DEN tratados y no tratados con el inhibidor de PARP-1, DPQ.

Los resultados obtenidos del análisis de los extractos nucleares procedentes de los hígados de los ratones control y de los sometidos al protocolo de inducción tumoral tratados o no con DPQ, mediante ensayos de geles de retardo, nos muestran que los ratones tratados con el inhibidor presentan significativamente una menor transactivación de NF-kB (unión de NF-kB al ADN) comparados con los no tratados (161.1% vs 267.52%,  $P \leq 0.01$ ) (Figura 2).




---

**Figura 2.- Figura 2: Activación del factor de transcripción NF-kB.** (A) Medidas de la unión de NF-kB a las secuencias kB del ADN mediante ensayos de gel de retardo o EMSA. En la figura se muestran tres experimentos independientes procedentes de extractos nucleares de tres ratones diferentes para cada condición. Los extractos nucleares de los ratones tratados con DPQ muestran una disminución de la unión del NF-kB al ADN o activación en comparación a los no tratados. (B) Densitometría de los niveles relativos de unión de NF-kB al ADN. Las intensidades de las bandas obtenidas en el gel de retardo o EMSA fueron digitalizadas mediante el escáner Store 840 Phospho-Image System y sus intensidades cuantificadas usando el software ImageQuant 5.2. Las barras de error representan el error estándar de las medias (SEM) correspondientes a tres experimentos independientes. \* $P \leq 0.01$  con respecto a ratones tratados con o sin DPQ.

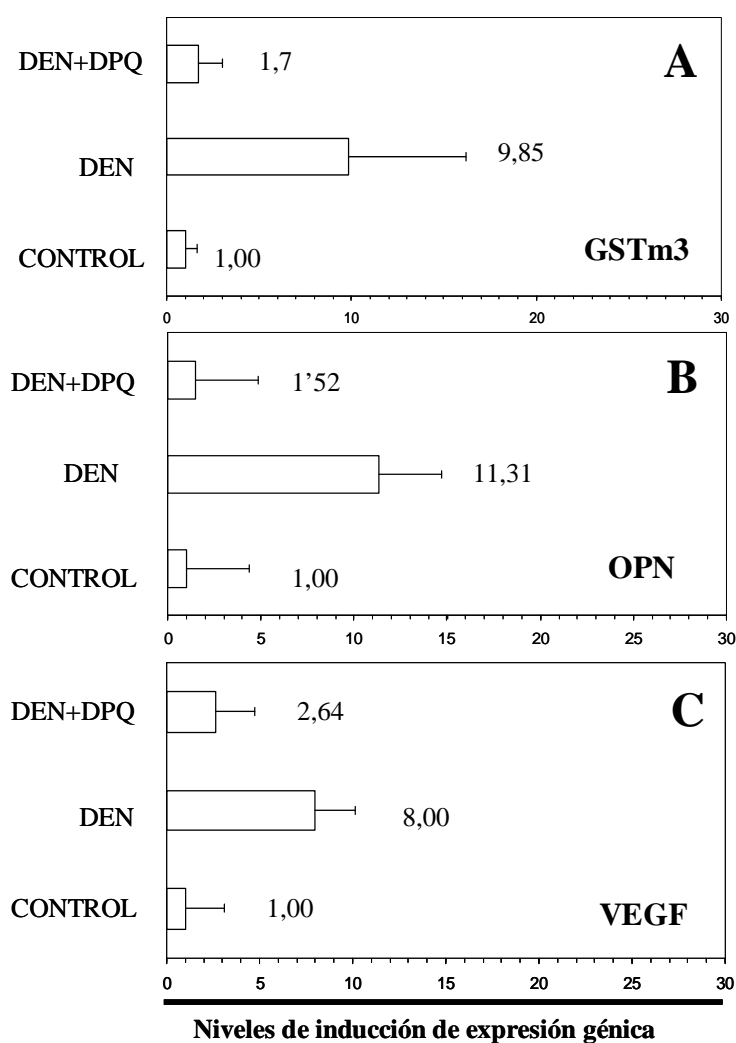
---

### **2.4.3.- El tratamiento con inhibidor de PARP-1 reprime la expresión génica de marcadores tumorales de hepatocarcinogénesis.**

El CHC, al igual que otros tumores, es el resultado de un proceso en múltiples etapas donde ocurren alteraciones genéticas que se irán acumulando durante la progresión. Sin embargo, los mecanismos precisos de la hepatocarcinogénesis y la progresión del CHC son aún desconocidos. Numerosos estudios realizados basados en los modelos de expresión génica del CHC han podido identificar un gran número de marcadores cuya expresión se encuentra inducida en estos tumores. Nosotros hemos analizado la variación en los niveles de expresión de tres destacados marcadores de CHC, glutatión-S-transferasa (GstM3), osteopontina (OPN) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en el ARN extraído de los hígados de los ratones tratados con el carcinógeno químico DEN en presencia o ausencia del inhibidor de PARP-1. Las glutatión-S-transferasas (GSTs) constituyen una familia de isoenzimas que protegen frente al estrés oxidativo tanto endógeno como el producido por toxinas exógenas. Están codificadas por 16 genes, subdivididos en 8 clases distintas, altamente polimórficas, y cuyas variantes genéticas se consideran un factor de riesgo de CHC (White DL et al, 2007). La función de las GSTs es la de detoxificar una gran variedad de compuestos electrofílicos, incluyendo la neutralización de carcinógenos como la dietilnitrosamina. En un estudio anterior, en el tratamiento con el carcinogénico hepático DEN se observa un incremento en la expresión de la GSTm3 (Hokaiwado N et al, 2003). En nuestro estudio, el análisis de expresión de la GSTm3 mediante PCR en tiempo real muestra como el tratamiento con el inhibidor de PARP-1 reprime la expresión de la GSTm3 tras el tratamiento con DEN a unos niveles similares a los ratones control. En cambio, en los ratones tratados con DEN en ausencia de DPQ, la expresión de la GSTm3 está aumentada (Figura 3A). Otro de los marcadores analizados ha sido la osteopontina u OPN. Ésta es una glicoproteína de adhesión secretada por células del sistema inmune, tejido epitelial, células del músculo liso, osteoblastos y células tumorales. Se ha podido demostrar por numerosos estudios que la OPN juega un papel importante en la patogénesis de numerosas enfermedades inflamatorias y procesos fibróticos, aumentando su expresión en modelos murinos

de fibrosis hepática (Zhao L et al, 2007). Además, en el hígado, las células Kupffer secretan OPN facilitando la infiltración de macrófagos en las áreas necróticas durante las fases tempranas de daño hepático, mediando por tanto la inflamación debida a toxicidad hepática (Ramaiah SK et al, 2007). Esta glicoproteína puede ser considerada como un biomarcador de supervivencia de pacientes con hepatitis B, además de evaluar el riesgo de cirrosis y CHC (Zhao L et al, 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de la OPN también es utilizada como factor pronóstico desfavorable de la recurrencia temprana del CHC por su implicación en la tumorigénesis y metástasis (Pan HW et al, 2003; Sun B et al, 2007). Nuestros resultados revelan que la inhibición de PARP-1 en los ratones sometidos al carcinógeno DEN reprimen la expresión de la OPN a unos niveles similares a los controles e incrementándose en ausencia de DPQ (Figura3B), al igual que ocurre con la GSTm3. Estas diferencias en los niveles de expresión génica también se observan en el otro marcador analizado, el VEGF (Figura 3C). Este factor de crecimiento juega un papel principal en la ocurrencia, progresión y metástasis del CHC (Zhang TY et al, 2004). El CHC es un tumor hipervasculoso que expresa numerosos factores angiogénicos como el VEGF (Yamaguchi R et al, 1998), el cual es considerado el mayor estímulo del proceso de angiogénesis. El grado de vascularización es una de las características que diferencian a la cirrosis y al CHC, siendo el VEGF el mayor estímulo de angiogénesis en estas enfermedades hepáticas, aumentando su expresión en el parénquima hepático en las cirrosis y en el CHC (Brodsky SV et al, 2007).

En resumen, los resultados obtenidos en los ensayos de PCR en tiempo real demuestran que la inhibición de PARP-1 disminuye la expresión de los marcadores de hepatocarcinogénesis analizados, retrasando el desarrollo tumoral en las fases iniciales del CHC en un modelo animal tras la exposición al carcinógeno hepático DEN.



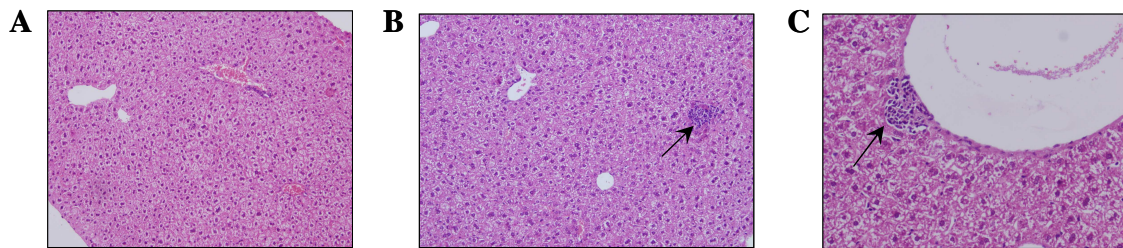
**Figura 3: Niveles de expresión génica de GSTm3, OPN y VEGF mediante PCR a tiempo real.**

Representación de los niveles de expresión del Gstm3, OPN y VEGF en los ratones tratados con el carcinógeno químico DEN en ausencia y presencia de DPQ y en los ratones control. La figura muestra los valores de inducción obtenidos para cada gen correspondiente a un único experimento realizado por triplicado. Otro segundo experimento fue realizado obteniéndose la misma tendencia en la inducción para cada uno de los genes y condición de estudio.

#### **2.4.4.- La terapia con inhibidores de PARP-1 no altera las estructuras morfológicas del hígado.**

En los estudios histológicos de todos los hígados, tanto de controles como de los grupos tratados con DEN y con DEN+DPQ, las lesiones observadas han sido algunos focos inflamatorios que pueden ir acompañados de hepatocitos necróticos localizados en los lobulillos, sin distribución zonal específica (Figura 4).

En todos los cortes histológicos la arquitectura trabecular está conservada y en ninguno de ellos se han apreciado focos de hiperplasia ni neoplasias; la valoración inmunohistoquímica de GSTp ha dado resultado negativo en las secciones de hígado (con positividad en los cortes de tiroides usados como control). Se han observado con frecuencia hepatocitos binucleados, aunque el índice proliferativo (ki67) ha sido inferior al 1%.



---

**Figura 4: Imágenes representativas de las secciones de los hígados de cada grupo animal.**

Ejemplos de fotografías de las secciones de los hígados teñidos con H&E de los ratones control (A), de los tratados con el carcinógeno hepático DEN en ausencia de DPQ (B) y en presencia del DPQ (C). Obsérvese focos necroinflamatorios, en ausencia de DPQ, y focos inflamatorios, en presencia de DPQ (señalados con flechas negras).

---



## 2.5.- DISCUSIÓN.

Gracias al desarrollo de inhibidores específicos de PARP-1 y al uso de ratones PARP-1 knockout se ha propuesto a PARP-1 como una nueva diana anti-neoplásica. En los ratones *parp-1*<sup>-/-</sup> se ha demostrado que son altamente resistentes al choque séptico inducido por lipopolisacáridos y además la respuesta inflamatoria está muy limitada debido a la inactivación del factor NF-KB (Oliver et al. 1999). Esta asociación funcional entre PARP-1 y NF-KB podría ser la causa de la resistencia de los ratones PARP-1 knockout a la respuesta inflamatoria que tiene lugar en diversas patologías como la isquemia cerebral (Eliasson MJ. et al. 1997), diabetes tipo I (Burkart V. et al. 1999, Masutani M. et al. 1999) o artritis reumatoide (Szabo C. et al. 1998). El NF-KB además es un factor que participa en la proliferación celular, invasión, angiogénesis y metástasis (Gilmore T. et al. 2002). Las patologías hepáticas que cursan con fenómenos de inflamación crónica, como las infecciones por el virus de la hepatitis C y B, podrían ser candidatas a tratamientos con inhibidores de PARP-1. Además, nuestros resultados *in vitro* con líneas de CHC muestran el efecto potenciador de la terapia combinada de doxorubicina e inhibidor de PARP-1, mientras que esto no ocurre en los hepatocitos no transformados.

Utilizando ratones PARP-1 parentales tratados con una única dosis del carcinógeno hepático DEN, hemos obtenido un modelo *in vivo* que representa las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis. En los hallazgos histopatológicos se han encontrado focos necroinflamatorios que son inespecíficos, ya que se han observado tanto en los animales control, no tratados ni con el carcinógeno ni inhibidor de PARP-1, como en los sometidos a inducción tumoral, tratados o no con el DPQ, inhibidor químico específico de PARP-1. La expresión inmunohistoquímica de GSTp ha sido considerada como “marcador” de cambio preneoplásico inducido por determinados agentes químicos en ratas (Tatematsu et al, 1988; Morimura et al, 1993; Iddamaldeniya et al, 2003) y no se expresa en hepatocitos normales, como ha ocurrido en el examen histopatológico de los hígados de animales tratados con DEN. Este hecho puede ser debido a que la expresión morfológica de los cambios preneoplásicos suele ser de aparición más tardía que los cambios bioquímicos. Además, hay que destacar que los ratones C57BL6 son relativamente resistentes a la



tumorogénesis hepática, además de presentar unos niveles basales de proliferación celular hepática elevada (Counts JL et al, 1996).

A diferencia del estudio histológico, en los bioquímicos sí se han encontrado diferencias muy significativas entre los ratones que fueron sometidos a tratamiento con el inhibidor de PARP-1, el DPQ. La proliferación celular analizada por incorporación de BrdU (Figura 1), está disminuida en los hepatocitos procedentes de los hígados de los ratones tratados con el DPQ, lo mismo ocurre con la activación del NF-kB (Figura 2).

Estos resultados nos indican que en la fase inicial de hepatocarcinogénesis, la inhibición de PARP-1 está disminuyendo el fenómeno inflamatorio, y por tanto, el desarrollo tumoral. Los análisis de PCR a tiempo real corroboran este hecho. Los genes estudiados, como el Gstm3 (glutación-S-transferasa), OPN (osteopontina) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Figura 3), relacionados con la inflamación y el desarrollo tumoral, presentan unos niveles de expresión significativamente menores en los ratones tratados con el DPQ en comparación a los no tratados, sometidos al carcinógeno hepático DEN.

Los datos obtenidos muestran como la inhibición de PARP-1 podría afectar a largo plazo a la activación del NF-kB y a genes involucrados en la inflamación y progresión tumoral, lo que previene de la activación masiva de PARP-1. A su vez, podría proteger del daño tisular derivado de la inflamación en las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis y a su vez prevenir la cascada de mediadores proinflamatorios que llevan a la activación crónica de NF-kB durante la inducción de CHC.

## **BIBLIOGRAFÍA**



Arsura M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2005; 229:157–169.

Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*, 2002; 64:883-88.

Brodsky SV, Mendeleev N, Melamed M, et al. Vascular density and VEGF expression in hepatic lesions. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16(4):373-377.

Burbach GJ, Dehn D, Del Turco D, et al. Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR. *J Neurosci Methods* 2003; 131:83-91.

Burkart V, Wang ZQ, Radons JR et al. Mice lacking the poly (ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med* 1999; 5:314-319.

Counts JL, Sarmiento JI, Harbison M, et al. Cell proliferation and global methylation status changes in mouse liver after phenobarbital and/or choline-devoid, methionine-deficient diet administration. *Carcinogenesis* 1996; 17(6): 1251-1257.

Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS et al. Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 1997; 3:1089-1095.

Gilmore T, Gapuzan M.E, Kalaitzitis D&Starczynowski D. Rel/NF-KB/IKappaB signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Lett* 2002; 181:1-9.

Goldfarb S, Pugh TD, Koen H, et al. Preneoplastic and neoplastic progression during hepatocarcinogenesis in mice injected with diethylnitrosamine in infancy. *Carcinogenesis* 1995; 16(8):1993-1996.

Gotoh M, Sakamoto M, Kanetaka K, et al. Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma. *Pathology International* 2002; 52:19-24.

Hassa PO, Covic M, Hasan S, et al. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappaB coactivator function. *J Biol Chem* 2001; 276: 45588-45597.

Hassa PO. & Hottiger MO. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 1999; 380: 953-959.

Hildt E, Saher G, Bruss V, et al. The hepatitis B virus large surface protein is a transcriptional activator. *Virology* 1996; 225:235-239.

Hokaiwado N, Asamoto M, Tsujimura K et al. Rapid análisis of gene expression changes caused by liver carcinogens and chemopreventive agents using a newly developed three-dimensional microarray system. *Cancer Sci*, 2004, 95:123-130.

Hubert E. Blum. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Best Practice & Research Clin. Gastroenterology* 2005; 19 (1): 129-145.

Iddamaldeniya SS, Wickramasinghe N, Thabrew I, et al. Protection against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenesis by an indigenous medicine comprised of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra*: a preliminary study. *J Carcinog.* 2003; 2: 1-6.

Luo J-L, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 2005;115:2625-2632.

Masutani M, Suzuki H, Kamada N et al. Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2301-2304.

Menissier-de Murcia, J. et al. Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:7303-7307.

Morimura S, Suzuki T, Hochi S, et al. Trans-activation of glutathione transferase P gene during chemical hepatocarcinogenesis of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:2065-8.

Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP)-ribose polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 1999; 18:4446-54

Pan HW, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98(1):119-127.

Pikarski E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431:461–466.

Qian J, Niu J, Li M, et al. In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; 65:5045-5053.

Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity and cancer. *Toxicol Sci* 2007; Sep 22.

Ramaiah SK, Rittling S. Role of osteopontin in regulating hepatic inflammatory responses and toxic liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007; 3(4):519-526.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60.

Sun B, Wu J, Zhang T, et al. High-resolution analysis of genomic profiles of hepatocellular carcinoma cells with differential osteopontin expression. *Cancer Biol Ther* 2007; Dec 2; 7(3).

Szabo C, Dawson VL. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci.*1998; 19 (7):287-298.

Tai DI, Tsai SL, Chang YH, et al. Constitutive activation of nuclear factor kB in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 89(11): 2274-2281.

Tai DI, Tsai SL, Chen YM, et al. Activation of nuclear factor kB in hepatitis C virus infection : implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2000; 31:656-664.

Tatematsu M, Tsuda H, Shirai T, et al. Placental glutathione S-transferase (GST-P) as a new marker for hepatocarcinogenesis: in vivo short-term screening for hepatocarcinogens. *Toxicol Pathol.* 1987; 15:60-8.

Velasco M, Diaz-Guerra MJ, Martín-Sanz P et al. Rapid up-regulation of IKappaB and abrogation of NF-KappaB activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 23025-23030.

Wang KK, Liu N, Radulovich N, et al. Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene* 2002; 21:7598-7604.

Wang XJ, Liefer KM, Tsai S, et al. Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor  $\beta$ 1 in the epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8483-8488.

White DL, Li D, Nurgalieva Z, et al. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma : a huge systematic review and meta-analysis. *American J. Of Epidem.* 2007; 167(4):377-389.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22:130-1, 134-8.

Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269:4705-4708.

Zhang TY, An JL, Gu JY, et al. Expression of PTEN, Cx43 and VEGF in hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2004; 23(6):662-666.

Zhao L, Li T, Wang Y, et al. Elevated plasma osteopontin level is predictive of cirrhosis in patients with hepatitis B infection. *Int J Clin Pract* 2007; May 30.

Zhu CQ, Blackhall FH, Pintilie M, et al. Skp2 gene copy number aberrations are common in non-small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1984-1991.





### **CAPÍTULO III:**

**LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD  
ENZIMÁTICA DE PARP-1 MODULA LA EXPRESIÓN  
GÉNICA EN XENOGRAFOS TUMORALES DE  
HEPATOCARCINOMA HUMANO.**



### 3.1 RESUMEN

La incidencia del carcinoma hepatocelular (CHC) se ha duplicado en las últimas cuatro décadas, siendo la principal causa de muerte en los pacientes cirróticos. La quimioterapia sistémica no ha mostrado un beneficio en términos de supervivencia en ensayos clínicos aleatorizados, acompañándose de elevadas cifras de toxicidad. El conocimiento de las bases moleculares del CHC mediante estudios genómicos puede permitir diseñar nuevas estrategias terapéuticas para afrontar esta devastadora enfermedad. En la aparición del carcinoma hepatocelular (CHC) juega un papel importante las lesiones del ADN junto con la respuesta inflamatoria y la generación de especies reactivas del oxígeno. Por este motivo, los mecanismos responsables de la reparación del ADN y de la respuesta inflamatoria se utilizan para estudiar nuevas dianas en las terapias del cáncer. Una de las proteínas que participan en estos mecanismos es la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). En este trabajo, hemos analizado el efecto de la inhibición farmacológica de PARP sobre 1) el crecimiento tumoral de xenógrafos de CHC y sobre 2) el perfil de expresión génica en dicho modelo. Los resultados obtenidos muestran una disminución no significativa del volumen tumoral del xenógrafo tras tratamiento con DPQ (564 mm<sup>3</sup> vs. 394 mm<sup>3</sup>). Por otro lado, los tumores crecieron en tamaño en los ratones no tratados (445 mm<sup>3</sup> vs. 2942 mm<sup>3</sup>, P<0.05). Estos datos muestran diferencias significativas de los volúmenes tumorales finales entre el grupo control y el tratado con DPQ (2148 vs. 394, P<0.05). El estudio histológico de los xenógrafos mostró que los tumores tratados presentaron una menor tasa de mitosis (29.4 vs. 72.4, P=0.02), una mayor proporción de apoptosis (28.11 vs. 12.50, P=0.04) y un descenso en los procesos de angiogénesis medidos como número de vasos por mm<sup>2</sup> (81.3 vs. 200.6, P=0.007). El análisis de la expresión génica indica que el tratamiento con el inhibidor incrementa la expresión de ciertos oncogenes (JunD, Hoxa1, MDM2, RAB32, entre otros). Por otro lado, los xenógrafos de los ratones tratados presentaban una elevada inducción de genes supresores de tumores (EGLN1, SFRP1, PRTFDC1, RBBP6). Otros genes interesantes implicados en la inducción y progresión tumoral que se encuentran sobre-expresados en los xenógrafos control son los siguientes (HGF, PDGF, HIF2- $\alpha$ , VEGFR1, ANGPTL1, SOX2, PIK3CA, IGFBP7, IRS2, OPN, EGFR). En resumen, los resultados obtenidos indican

que los inhibidores de PARP podrían ser una alternativa terapéutica en el tratamiento del CHC, abriendo un nuevo camino para el diseño de una nuevas estrategias más efectivas y menos nocivas frente a la lucha contra el cáncer hepático.

### 3.2 INTRODUCCIÓN

El hepatocarcinoma es el quinto tumor con mayor incidencia y la tercera causa de muerte atribuida al cáncer en el mundo (Llovet et al, 2003). Su desarrollo es debido a un proceso de carcinogénesis en varias etapas, en las cuales se van acumulando aberraciones genéticas que conllevan a una desregulación de la homeostasis celular que se traduce en alteraciones en los mecanismos de proliferación celular, reparación del ADN y apoptóticos (Thorgeirsson et al, 2002).

Las opciones de tratamiento para los pacientes de hepatocarcinoma, son actualmente poco esperanzadoras, optando sólo un 40% aproximadamente, en los países occidentales, a ser candidatos de tratamiento curativo (cirugía, trasplante, ablación percutánea), mientras que en pacientes con tumores avanzados, la utilización de drogas quimioterapéuticas, no ofrecen un beneficio en términos de supervivencia. Por tanto, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas se ha convertido en un objetivo de primer orden.

En este trabajo presentamos a la proteína PARP-1 como posible nueva diana para el tratamiento del hepatocarcinoma. La enzima nuclear PARP-1 es una enzima nuclear que se activa en respuesta a daños en el ADN y transforma el compuesto  $\text{NAD}^+$  ( $\beta$ -nicotinamida adenindinucleótido) en largos y ramificados polímeros de poli (ADP-ribosa) (PAR) sobre múltiples proteínas nucleares. Además de su implicación en los procesos de reparación de daños en el ADN, a PARP-1 se le han propuesto diferentes funciones entre las que destacan su papel como cofactor transcripcional y su implicación en procesos de muerte celular. Debido a su gran relevancia en funciones vitales en la célula, durante la última década se han investigado cuales serían las consecuencias de su inhibición en la terapias con drogas antitumorales de unión al ADN (Calabrese et al 2003). Estos estudios han revelado que la inhibición química de PARP-1 puede constituir un modo efectivo de potenciar la muerte celular originada por drogas antitumorales que producen roturas tanto simples como dobles en la molécula de ADN (Delaney et al 2000). Nuestro laboratorio ha puesto de manifiesto que el uso de inhibidores de PARP (ANI y DPQ, entre otros), junto con el quimioterapéutico doxorubicina, potencian la muerte celular en diferentes líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma humano. Por otro lado, el empleo de dichos inhibidores químicos sobre diversas líneas celulares de hepatocitos no tumorales no desencadenan en el incremento de la toxicidad celular generada por estos agentes genotóxicos (resultados

expuestos el capítulo I de la presente Tesis Doctoral). Como se ha comentado anteriormente, en la práctica clínica, el gran problema que se deriva del tratamiento con drogas antitumorales frente al hepatocarcinoma son el poco rendimiento de dichos fármacos junto con los altos niveles de toxicidad, y de muerte que presentan. Con el objetivo de reducir estos efectos nocivos y reducir el crecimiento tumoral, en el presente capítulo se plantea el uso de inhibidores de PARP como monoterapia frente al hepatocarcinoma. Recientemente, varios estudios han demostrado que los inhibidores de PARP-1 por sí solos pueden tener un efecto citotóxico directo frente a células tumorales (Mendeleyev et al 1995; Weltin et al 1994; Helen et al 2005; Hannah et al 2005). La inhibición de la actividad PARP-1 origina defectos en los sistemas de reparación por escisión de bases (BER) lo que conlleva a la acumulación de daños en el ADN sin reparar, daños que en el caso de las células tumorales, altamente proliferativas, con defectos en otros sistemas de reparación y con altas tasas de mutaciones, son inviables con el mantenimiento de su alta actividad metabólica y funcional dirigiendo irremediablemente a la activación de los procesos de muerte celular. Por otro lado, las células no tumorales, menos proliferativas, con otros sistemas de reparación de daños activos, tienen más tiempo y recursos para la reparación de dichos daños, por lo que dichas células están protegidas frente a los procesos de muerte celular.

Apoyándonos en estos trabajos previos, hemos estudiado el efecto de la inhibición farmacológica de PARP-1 en un modelo de hepatocarcinoma humano in vivo. Los resultados obtenidos muestran que el inhibidor DPQ utilizado como monoterapia reduce significativamente el crecimiento tumoral de los xenógrafos en los ratones desnudos tratados farmacológicamente con este inhibidor comparados con los xenógrafos tumorales de los ratones no tratados, debido entre otras causas a una reducción del índice mitótico, a un aumento de los eventos apoptóticos y a un menor riego sanguíneo originado por una menor formación de vasos en el interior del mismo. El estudio se ha completado con el análisis de la expresión génica en los xenógrafos de los ratones tratados con DPQ comparándolos con los no tratados, mediante microarrays de expresión de ADN o GeneChip de Affymetrix. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con DPQ produce modificaciones en la expresión génica con respecto a los xenógrafos de ratones no tratados, entre los que cabe destacar el aumento de la expresión de genes supresores de tumores y la disminución de la expresión de genes relacionados con angiogénesis y metástasis, entre otros.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la inhibición farmacológica de PARP como monoterapia, puede representar una forma novedosa de tratamiento frente al hepatocarcinoma, presentando una gran efectividad al reducir considerablemente el crecimiento tumoral y reduciendo en gran medida los efectos adversos del uso de la tradicional quimioterapia.





### 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1- Protocolo de carcinogénesis hepática humana en un modelo de ratones desnudos o inmunosuprimidos

Para el desarrollo de este estudio se han utilizado ratones macho inmunosuprimidos de fondo genético NCr y de 5 semanas de edad suministrados por la empresa “Taconic Farms Inc.” y mantenidos por el Servicio de animalario del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neira”, CSIC (Granada), de acuerdo a las normativas internacionales existentes de alojamiento. Transcurrida una semana de aclimatización a las condiciones del animalario, los ratones se sometieron a la implantación del xenógrafo de células tumorales HepG2. Esta línea de hepatocarcinoma humano se ha cultivado de igual forma a la descrita en la sección de materiales y métodos correspondiente al capítulo I (página 89). Posteriormente las células se recogieron usando Tripsina-EDTA (Sigma) y se contaron utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio óptico (Olympus). Un total de  $8 \times 10^6$  células HepG2 en 100  $\mu$ l de medio RPMI (Gibco) no suplementado con suero fueron inyectadas subcutáneamente en el muslo derecho de cada ratón inmunosuprimido. El tratamiento animal se inició cuando el tumor alcanzó un volumen superior a 400-600  $\text{mm}^3$ , aproximadamente un mes después de la inyección de células. El inhibidor de PARP, DPQ o 3,4-dihydro-5-[4-(piperidinyl)butoxyl-1(2H)isoquinolinon3] (ALEXIS BIOCHEMICALS) se administró a un grupo de ratones desnudos (Grupo Tratado, n=10) durante cuatro días consecutivos de tratamiento de forma intraperitoneal, a la concentración de 15  $\mu$ g por gramo de peso animal disuelto en suero fisiológico en un volumen final de 50  $\mu$ l. Otro grupo de ratones desnudos (Grupo Control, n=10) fue tratado intraperitonealmente con 50  $\mu$ l de suero fisiológico (vehículo). Los xenógrafos tumorales derivados de HepG2 se analizaron a diferentes tiempos mediante medición de su volumen utilizando un calibre. Dichas medidas se realizaron al comienzo y al final del tratamiento con DPQ, y tras la finalización del mismo, las medidas se realizaron en días alternos durante dos semanas. El volumen tumoral se estimó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \text{Longitud} \times \text{anchura}^2 \times \pi/6$$

Una vez realizadas las medidas tumorales necesarias, los animales se sacrificaron según los métodos de eutanasia del Servicio de animalario del CSIC y a continuación se procedió a la extracción del xenógrafo tumoral. Para la obtención del ARN total una porción del xenógrafo se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y el resto se fijó en formalina tamponada para el estudio histológico.

### **3.3.2- Extracción, purificación y precipitación del ARN total**

La extracción de ARN total procedente de los xenógrafos tumorales originados por la inyección de células HepG2, se realizó de forma similar a la descrita en la sección de materiales y métodos del capítulo II (página 124). Las muestras conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se disgregaron mediante la utilización de un bisturí. El material resultante de esta disgregación se introdujo en un tubo eppendorf al que se le añadió 1ml de Trizol (Gibco) para su posterior procesamiento. En la tecnología de microarray de ADN, la calidad del ARN utilizada es crítica para un correcto marcaje del ADN complementario o ADNc del microarray, por lo que se requiere un proceso de purificación y digestión con ADNasas del ARN obtenido. Por ello, una vez obtenido el precipitado que constituye el ARN total se procedió a su purificación mediante el uso de columnas utilizando el Rneasy Mini Kit (Qiagen) y tratamiento posterior con ADNasas (RNase-Free DNase Set, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al final de este proceso se obtuvo 100 $\mu\text{l}$  de eluido, el cual se sometió a un proceso de precipitación. Para ello, se añadió entre 0.2-0.4  $\mu\text{l}$  de acrilamida lineal (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Ambion), 0.5 volúmenes (50  $\mu\text{l}$ ) de  $\text{AcNH}_4$  7.5M (Merck) y 2.5 volúmenes (250  $\mu\text{l}$ ) de etanol absoluto (Merck). A continuación se dejó reposar durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se centrifugó la mezcla a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para separar el precipitado. Se realizan varios lavados del precipitado obtenido con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 13.000 r.p.m. 5 minutos y se deja secar al aire. El precipitado obtenido finalmente se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de agua milliQ, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para facilitar la resuspensión del ARN total.

A continuación, de cada muestra se recogieron 0.5  $\mu\text{l}$  de ARN (dilución 1:200) para su cuantificación y determinación de su pureza en el espectrofotómetro (Eppendorf). El resto, se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La concentración de ARN se calculó sabiendo que una unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de

muestra. Las cantidades de ARN total necesarias para los ensayos de hibridación de microarrays proporcionadas por el distribuidor (4 µg en un volumen final de 8 µl, por muestra) se alcanzaron con éxito. También se obtuvo la relación entre absorbancia a 260 nm y absorbancia a 280 nm ( $ABS_{260}/ABS_{280}$ ) para determinar el grado de pureza de las muestras. Esta relación resultó entre 1.7-2.05, valores aceptables de pureza de ARN para la realización de los análisis de expresión génica.

### **3.3.3- Microarrays de expresión de Affymetrix**

El estudio del perfil de expresión génica diferencial entre los xenógrafos tumorales derivados de la línea celular HepG2 en el Grupo Control y Tratado con el inhibidor DPQ, ha sido realizado en el “Instituto Recerca del Hospital Universitario Valle de Hebron” (Barcelona, España) por el Servicio de Análisis de Expresión Génica (Plataforma de Genómica) de la Unidad Cientificotécnica (UCTS). El protocolo de microarray de ADN realizado en este servicio ha sido el conocido como “técnica de microarrays de expresión de Affymetrix” (compañía líder en este tipo de chips), utilizándose el biochip de ADN Genechip® (Affymetrix).

Para este estudio genómico se seleccionaron tres xenógrafos tumorales del Grupo Control y otros tres del Grupo Tratado con el inhibidor DPQ, de los cuales se les envió el ARN total obtenido según se indica en el apartado anterior. Sobre este ARN se procedió al re-análisis de la cantidad y calidad mediante el Bioanalizador de Agilent, superando en todos los casos el control de calidad establecido por el fabricante. Para la realización del microarray de expresión se utilizó el kit “One-Cycle Target Labeling Kit” (Affymetrix), para el que se necesitó 4 µg de ARN total por muestra. Las diferentes partes de este proceso consistieron en: 1) síntesis de ADN complementario o ADNc de doble cadena, 2) ARN complementario o ARNc biotinilado, 3) fragmentación, 4) hibridación, 5) lavado, 6) tinción con estreptavidina marcada con ficoeritrina y 6) escaneo de los chips. Estos procesos se detallan a continuación.

#### **3.3.3.1- Síntesis del ADNc mediante el kit “GeneChip® One-Cycle cDNA Síntesis Kit” (Affymetrix)**

A partir de ARN total procedente de los xenógrafos de HepG2 de los ratones desnudos NCr tanto tratados como de los no tratados con el inhibidor DPQ, una vez

superado el control de calidad en el Bioanalizador de Agilent y antes de la fase de síntesis del ADNc de doble cadena, a las muestras de ARN se les añade una pre-mezcla de 4 controles procariotas poliadenilados (lys, phe, thr y dap), procedentes de *Bacillus subtilis*, utilizando el kit Eukatyotic Poli-A RNA Control Kit, los cuales serán utilizados como indicadores de la sensibilidad y eficiencia de la técnica. Posteriormente se procede a la síntesis de ADNc de doble cadena utilizándose el “kit GeneChip® One-Cycle cDNA Síntesis Kit” (fabricado por Invitrogen para Affymetrix). Este kit contiene todos los reactivos necesarios para la obtención de ADNc de doble cadena conteniendo la secuencia promotora del fago T7, utilizando el cebador 5' – GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CT C ACT ATA GGG AGG CGG – (dT)<sub>24</sub> – 3', a partir de 4 µg de ARN total por muestra. Este paso consiste en una reacción de transcripción inversa o retro-transcripción a partir de ARN total para sintetizar ADNc que será purificado y servirá como molde para el siguiente paso o reacción de transcripción in vitro sintetizándose ARN complementario o ARNc, que será amplificado y marcado con biotina, para hibridarse con los oligonucleótidos del GeneChip® del array. La reacción de transcripción inversa o retro-transcripción es llevada a cabo utilizando el SuperScript™ II (Invitrogene), cuyos componentes son: T7-Oligo(dT) Primer 50 µM, 5X 1st Strand Reaction Mix, DTT 0.1 M, dNTP 10mM, SuperScript™ II 200U/µl, 5X 2nd Strand Reaction Mix, E.coli DNA Ligase 10U/µl, E.coli DNA Polymerase I 10U/µl, RNase H 2U/µl, T4 DNA Polymerase 5U/µl, EDTA 0.5M y RNase-free Water. Posteriormente, una vez sintetizado el ADNc de doble cadena, se realiza un paso de purificación o lavado en el “GeneChip® Simple Cleanup Module” fabricado por QIAGEN® específicamente para los arrays GeneChip. La purificación se realizó mediante el uso de columnas (QIAGEN®) obteniéndose un volumen y concentración del eluido adecuado, eliminando la necesidad de concentrar las muestras.

### **3.3.3.2- Síntesis de ARNc biotinilado mediante el kit “GeneChip® IVT Labeling Kit” (Affymetrix)**

Tras la obtención y purificación del ADNc de doble cadena, se procede a la realización de una reacción de transcripción in vitro para la amplificación y marcaje con biotina del ARNc utilizando para ello el “kit GeneChip® IVT Labeling Kit” utilizando el MEGAscript® (Ambion), cuyos componentes son: 10X IVT Labeling Buffer, IVT

Labeling Enzyme Mix, IVT Labeling NTP Mix, 3'-Labeling Control 0.5µg/µl y RNase-free Water. El kit contiene además un control positivo de doble cadena que comprueba la actividad transcripcional de los componentes del dicho equipamiento. De este modo, utilizándose la propiedad de sintetizar análogos de nucleótidos biotinilados en la reacción de transcripción in vitro o reacción IVT mediante el MEGAscript® (Ambion) se obtiene un alto rendimiento de ARNc y una eficiencia de incorporación uniforme. Posteriormente, una vez obtenido el ARNc biotinilado, se procedió a su lavado en el GeneChip® Simple Cleanup Module (QIAGEN®), y mediante el bioanalizador o Bioanalyzer de Agilent se analizó la calidad de síntesis del ARNc. Previo a la hibridación con el GeneChip, se realizó la fragmentación del ARNc en el GeneChip® Simple Cleanup Module (QIAGEN®), y la eficiencia de fragmentación también se analizó en el bioanalizador o Bioanalyzer de Agilent.

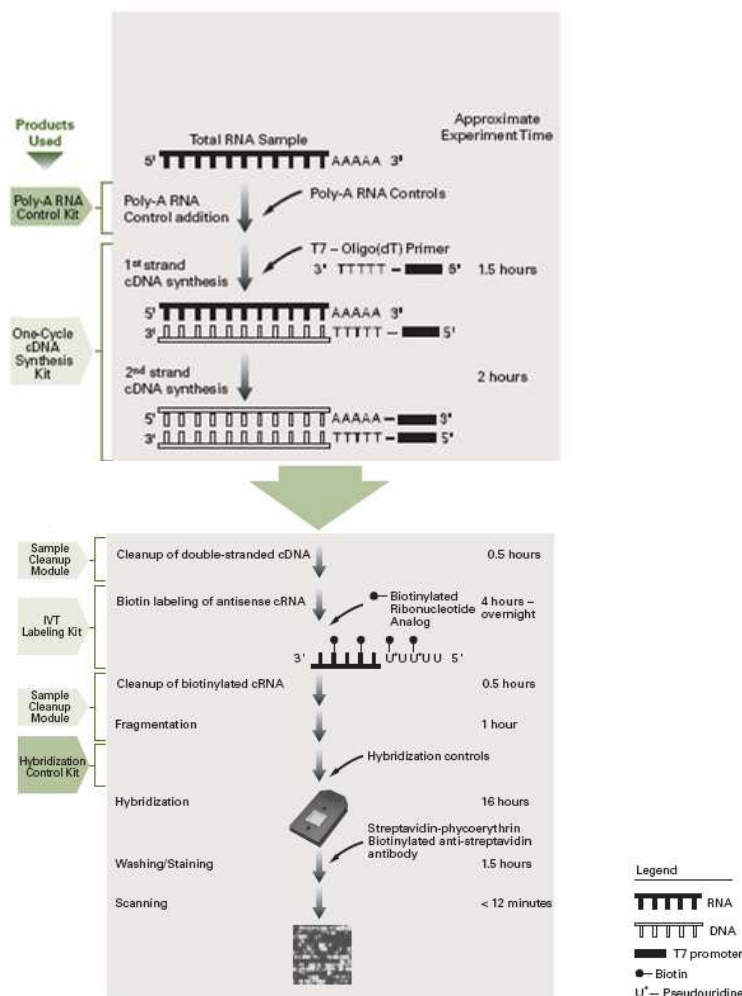
### **3.3.3.3- Hibridación con el GeneChip Human Genome U133 PLUS 2,3 (Affymetrix)**

Una vez analizada la calidad del ARNc para todas las muestras y tras un resultado positivo se procedió a la hibridación de las muestras. El GeneChip utilizado fue: "Human Genome U133 PLUS 2,3" (HG-U133 Plus 2,3). Este GeneChip es el primer chip de expresión de ADN que comprende el genoma humano en su totalidad. Este biochip de ADN se utiliza para la cuantificación y análisis de expresión génica diferencial. Cada sonda está representada por una secuencia de oligonucleótidos de 25 pb, inmovilizadas en un soporte de vidrio, sintetizados in situ por fotolitografía. El GeneChip HG-U133 Plus 2,3 contiene más de 54.000 grupos de secuencias de oligonucleótidos para analizar los niveles de expresión de más de 47.000 transcritos y sus variantes, incluyendo aproximadamente 38.500 genes humanos bien caracterizados. Las secuencias que forman esos grupos de sondas o probe sets han sido seleccionadas a partir de GenBank®, dbEST, RefSeq y UniGene. Cada grupo de sondas se utilizará para medir los niveles de ARN mensajero o ARNm de un único gen y constan de múltiples pares de celdas con millones de copias de un oligonucleótido de 25pb, organizadas en parejas con un "perfect match" (PM) que coincide exactamente con una parte del gen a estudio, y un "mismatch" (MM), idéntico al PM excepto en el nucleótido central reemplazado por su complementario. Por tanto, distintos pares de sondas representan partes distintas del mismo gen y esas sondas serán seleccionadas para ser específicas del

gen que representan y para tener buenas propiedades de hibridación. La hibridación se llevó a cabo depositando sobre el GeneChip los fragmentos de ARNc biotinilado. Además, para verificar la eficiencia del proceso de hibridación se utilizó el kit “Eukaryotic Hybridization Control Kit” (GeneChip®) compuesto por una pre-mezcla de fragmentos de ARNc marcado con biotina procedentes de E.coli (BioB, BioC, BioD) y del bacteriófago P1 (CreX), el cual fue añadido directamente al cóctel de hibridación. Este kit contiene también el llamado “Control Oligo B2”, que proporciona alineamiento de las señales en el análisis de imagen. Además el GeneChip incluye diversos controles de hibridación y normalización compuestos por sondas de ADNc de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPH y de la beta-actina, como genes de control de expresión interna (housekeeping). Tras la hibridación se realizó un paso de lavado y de tinción, añadiendo estreptavidina marcada con ficoeritrina. Finalmente, después de la hibridación, se realizó el escaneo del microarray mediante el aparato “GeneChip Scanner 3000”. En la figura 1 se representa de forma esquematizada todo el proceso del microarray de expresión de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>).

## GeneChip® Eukaryotic Target Labeling Assays for Expression Analysis

### One-Cycle Target Labeling



---

**Figura 1.- Microarray de Expresión de Affymetrix.** Representación esquemática de la tecnología de microarrays desarrollada por Affymetrix. En este esquema se representan de una forma básica las distintas etapas del proceso: síntesis de ADNc de doble cadena a partir del ARN total de las muestras, transcripción inversa y marcaje con biotina del ARNc, fragmentación del ARNc, hibridación con el biochip, lavado, tinción y escaneo para análisis de los datos.

---

#### **3.3.3.4- Análisis de los datos de la hibridación con microarrays**

Las imágenes obtenidas se procesaron mediante el software “Microarray Análisis Suite 5.0” (Affymetrix) y los valores obtenidos se normalizaron con el método “RMA” (Irizarry et al. 2003), proceso que transcurre en tres etapas que integran corrección del fondo, normalización y resumen de los valores obtenidos. Tras la normalización de los resultados, se realizó una transformación matemática de los mismos aplicándoles a los valores de la absorbancia obtenidos el  $\text{Log}_2$  y con estos datos y mediante el programa informático “Array Assist de Stratagene”, se analizaron los niveles de expresión de cada gen y se consideraron aquellas diferencias en la abundancia de ARN que suponían un incremento tanto positivo como negativo superior a dos veces ( $\text{two-fold} > 1$  ó  $\text{two-fold} < 1$ ) entre los ratones tratados con el inhibidor DPQ y los ratones control, es decir, los valores cuyo logaritmo en base 2 de la absorbancia de los tratados respecto a los controles eran mayor o menor de 1, lo que equivale a un incremento positivo o negativo superior a dos veces.

#### **3.3.4- PCR en tiempo real.**

Se realizaron PCRs Cuantitativas a Tiempo Real (qRT-PCR), con el objetivo de verificar los resultados obtenidos por el microArray de ADN. La reacción de qRT-PCR se llevó a cabo en el termociclador Mx 3000P (Stratagene) usando el kit “QuantiMix EASY SYG” (Biotools), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit contiene el agente intercalante SYBR Green específico de ADN de doble cadena que se une al ADN inmediatamente después de ser sintetizado y emite luz fluorescente tras estimulación (absorbancia a 497 nm y emisión a 520 nm). La emisión se recoge por el sistema detector del equipo en cada uno de los ciclos de la PCR. La fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN formado lo que nos permite conocer y



registrar en todo momento la cantidad de ADN formado en cada ciclo de amplificación (Wittwer et al. 1997). El ciclo de la PCR en el que empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN que presenta la muestra, es decir, más cantidad de ADN inicial, menor valor de Ct. Por tanto, comparando los Ct de las distintas muestras a ensayar se puede calcular el incremento de expresión génica de una determinada muestra respecto a una condición control.

Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es relativamente fácil. El principal inconveniente del SYBR es su baja especificidad, debido a que se une de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores frecuentes en la PCR. Por ello y para detectar posibles errores de amplificación de productos no deseados o cuantificación de dímeros de primers, el sistema de PCR en tiempo real Mx 3000P (Stratagene) posee un sistema de análisis denominado “Meeting Point” o curva de desnaturalización por calor, sistema muy útil para interpretar los resultados con el fin de asegurar la especificidad de los mismos (Ririe et al. 1997). En este análisis, las curvas de desnaturalización por calor correctas muestran un solo pico definido a temperaturas superiores a 81.5°C. Sin embargo, cuando se amplifican productos no deseados o se forman dímeros de primers, se observan picos secundarios, a temperaturas inferiores de 81°C (correspondientes a dímeros de cebadores) o superiores a esta (productos indeseados), los cuales son detectados y contribuyen al valor de las Ct de tal forma que los resultados son analizados de forma inadecuada al sobrevalorar el Ct real. Para validar los resultados obtenidos, también se realizaron curvas patrón con diferentes concentraciones de ADN, destinadas a comprobar el efecto de duplicación del ADN en cada ciclo de la PCR, independientemente de la concentración del ADN utilizada, de tal modo que esta curva patrón obtenida con diluciones seriadas debe tener un coeficiente de correlación  $> 0.98$  y una pendiente cuyo valor oscile entre  $(3.2 - 3.4) \pm (0.1)$ , además de una eficiencia de PCR próxima al 100%. Para evitar estas inespecificidades también es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas.

Para la realización de la PCR en tiempo real, parte del ARN obtenido para los ensayos de microarrays, fueron utilizados para la obtención de ADN complementario (ADNc) a través de la reacción de transcripción inversa, utilizando el “Kit iScript cDNA Síntesis” (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa

se llevó a cabo usando el programa térmico definido por el fabricante consistente en incubaciones a 25°C durante 5 minutos (pre-incubación), 42°C durante 30 minutos (transcripción reversa), 85°C durante 5 minutos (inactivación del enzima) y refrigeración a 4°C. Una vez obtenido el ADNc se procedió a la realización de la PCR en tiempo real utilizando el “Kit QuantiMix EASY SYG” (Biotools), anteriormente mencionado. Cada reacción de qRT-PCR (con un volumen final de 20 µl) se realizó por triplicado y utilizando para cada una 10 µl de reactivo “QuantiMix EASY SYG” (Biotools), 0.5 µM de cada uno de los cebadores tanto sentido como antisentido, 1 µl de ADNc (1 µg/µl) y agua milliQ estéril hasta completar 20 µl de reacción. El control negativo de la reacción de amplificación lo constituyeron otra serie de reacciones que incluyen 1 µl de agua milliQ estéril en lugar de ADNc. Para verificar que la cantidad de luz que llega al detector proviene de un solo producto, todas las reacciones se sometieron al protocolo de disociación por calor después del último ciclo (30-40 ciclos) de la qRT-PCR (Ririe et al. 1997). El perfil térmico utilizado para cada reacción de PCR fue el preestablecido en el software MxPro-Mx 3000P v.3.00 (Stratagene), con la salvedad de que la temperatura utilizada para la etapa de hibridación de la PCR correspondiente a las temperaturas óptimas de hibridación de cada uno de los cebadores utilizados, las cuales se pusieron a punto utilizando diferentes temperaturas y observando en cual de ellas se producía un menor valor del Ct, una curva de amplificación máxima, junto a una óptima curva de desnaturalización. La detección directa de los productos de PCR se monitorizó midiendo el incremento en la fluorescencia causada por la unión del colorante SYBR Green al ADN de cadena doble y calculando el valor Ct correspondiente a cada una de las muestras (Wittwer et al. 1997). Todas las muestras fueron normalizadas respecto a un gen de referencia (housekeeping) usado como control interno para la normalización de los datos. Entre todos los genes housekeeping revisados, el correspondiente a HPRD1 fue el menos variable y el que se utilizó para el control en todas las qRT-PCR en su proceso de normalización (Speleman et al. 2002).

La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando el método comparativo previamente descrito de las Ct (Wang et al. 2002; Zhu et al. 2004; Qian et al. 2005):  $n^{\circ}$  veces de inducción =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$  para un determinado gen de interés. Donde,  $\Delta Ct_{\text{muestra problema}}$  es el valor de la Ct de la muestra problema para un determinado gen normalizado y  $\Delta Ct_{\text{muestra control}}$  es el valor de la Ct de la muestra control sin tratar para ese mismo gen también normalizado según

la expresión del gen de referencia HPRT1. Para la validación del cálculo del  $\Delta\Delta C_t$  es necesario que las curvas patrón, tanto del gen de referencia como del gen a estudiar, cumpla los requisitos de eficiencia de PCR y coeficiente de correlación descritos anteriormente.

Además, con el objetivo de comprobar que el producto amplificado presenta el tamaño descrito en bibliografía y dilucidar si el producto de la PCR es un único compuesto, el producto resultante de la reacción de PCR se analizó por electroforesis de gel de agarosa, obteniéndose para todos los casos estudiados resultados positivos.

### **3.3.5- Estudio histológico de los xenógrafos tumorales de HepG2**

Las muestras de los xenógrafos procedentes de los ratones desnudos NCr en presencia o ausencia del inhibidor DPQ fueron diseccionadas, fijadas en formaldehído (Panreac) al 4% tamponado a pH 7, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (Merck), lavadas con xilol (Merck), embebidas en parafina, seccionadas en un microtomo Leica a 4- $\mu\text{m}$  y teñidas con los colorantes hematoxilina y eosina (H&E) o con la reacción de PAS (Periodic Acid Schiff). Se contabilizó por aspectos morfológicos el número de mitosis y eventos de apoptosis por  $\text{mm}^2$  en diez campos distintos por xenógrafo, con tinción de H&E, tomados al azar y utilizando para ello un microscopio Olympus BH2 a aumentos de 600X. También se contabilizó al microscopio el número de vasos sanguíneos por  $\text{mm}^2$  en diez campos distintos por xenógrafo a aumentos de 400X con tinción de H&E y PAS.

### **3.3.6- Análisis estadístico**

El análisis estadístico utilizado para comparar los valores de mitosis, apoptosis y formación de vasos, entre los xenógrafos de los ratones tratados con DPQ y los controles, ha sido el test no paramétrico de Mann-Whitney. Por otro lado, para comprobar si estos valores presentan diferencias significativas, se ha utilizado un test t de Student, considerándose un valor significativo cuando se obtienen valores de  $P < 0.05$ .

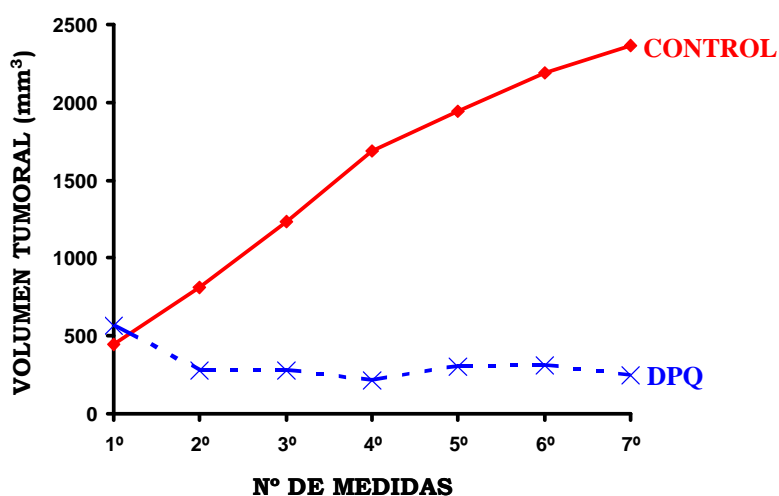
### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1. La inhibición farmacológica de la actividad enzimática de PARP disminuye el volumen de los xenógrafos derivados de hepatocarcinoma humano

Para estudiar el efecto antitumoral del inhibidor de la PARP (DPQ), como monoterapia en un modelo de hepatocarcinoma humano in vivo se utilizaron ratones inmunosuprimidos de fondo genético NCr, machos, de unas 5 semanas y de aproximadamente 20 gramos de peso. Transcurrida una semana de aclimatización a las condiciones del animalario, un total de 20 ratones (N=10, para el Grupo Control y N=10, para el Grupo Tratado con DPQ) fueron inyectados subcutáneamente con  $8 \times 10^6$  células HepG2, como se describe en el apartado de material y métodos correspondiente a este capítulo (pág. 157). Aproximadamente, un mes después de la implantación del xenógrafo de células HepG2, los xenógrafos tumorales alcanzaron el volumen estimado para el comienzo del tratamiento, es decir, entre 400-600 mm<sup>3</sup> (Wenli G. et al 2004). El tratamiento consistió en la administración intraperitoneal durante cuatro días consecutivos, del inhibidor DPQ a la concentración de 15 mg/Kg disuelto en un volumen final de 50µl de suero fisiológico. Al grupo control, se le inyectó paralelamente 50µl de suero fisiológico intraperitoneal. Los volúmenes tumorales fueron tomados mediante la utilización de un calibre y calculados a través de la siguiente fórmula: Volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) = Longitud  $\times$  anchura<sup>2</sup>  $\times$   $\pi/6$  (Wenli G. et al 2004). Las medidas fueron realizadas el día 1 o día de comienzo del tratamiento, el día 4 o día de final del tratamiento, y posteriormente se realizaron 5 medidas más en días alternos, tras los cuales los animales fueron sacrificados a las dos semanas del comienzo del tratamiento. Los valores medios (N=10) de los volúmenes tumorales de las diferentes mediciones realizadas se representan en la figura 2. Los resultados obtenidos muestran una disminución no significativa del volumen tumoral del xenógrafo en los ratones tratados con DPQ (564 mm<sup>3</sup> vs. 394 mm<sup>3</sup>). Por otro lado, en los ratones del Grupo Control, el volumen de los xenógrafos aumentó de manera muy significativa (446 mm<sup>3</sup> vs. 2942 mm<sup>3</sup>, P=0.015).

**A**

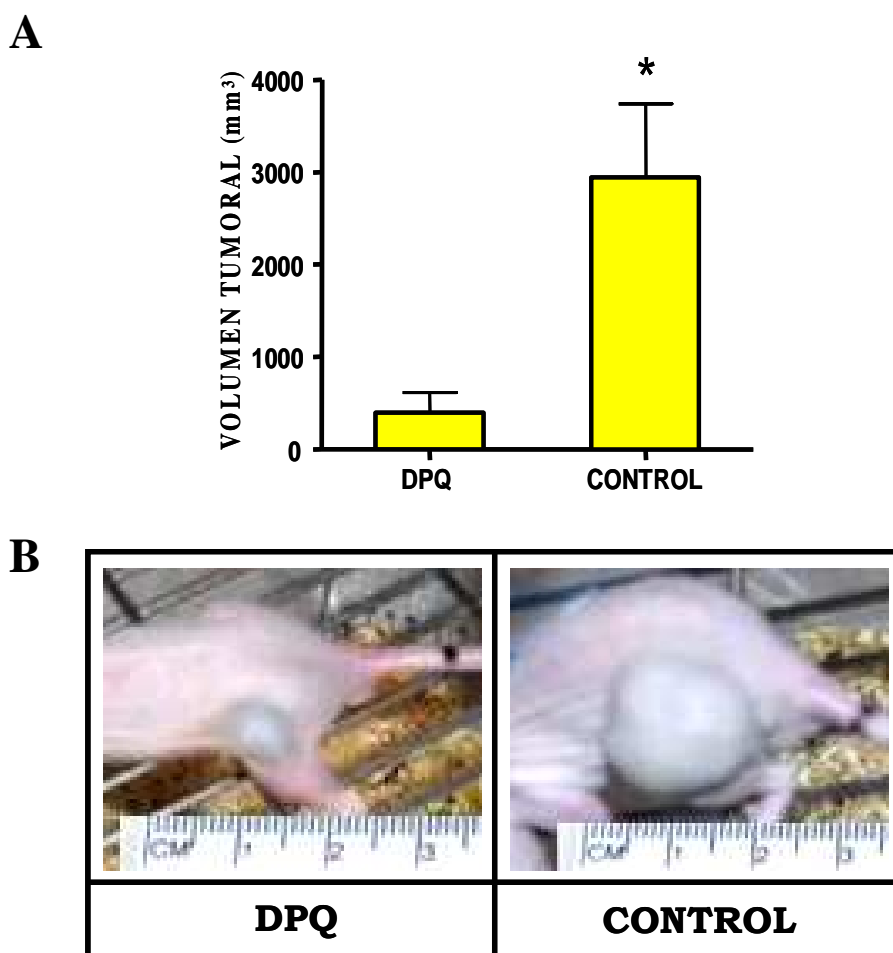
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
<b>CONTROL</b>	446	815	1232	1687	1944	2189	2942
<b>DPQ</b>	564	276	278	213	303	309	394

**B**

**Figura 2.- Medidas de los volúmenes tumorales en mm<sup>3</sup>.** (A) Valores medios de los volúmenes tumorales en mm<sup>3</sup> de los tumores xenógrafos de HepG2 del grupo control (N=10) y del tratado con DPQ (N=10), en las mediciones realizadas durante el experimento, utilizando un calibre manual. Los volúmenes fueron calculados utilizando la fórmula: Volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) = Longitud × anchura<sup>2</sup> × π/6. (B) Evolución del volumen tumoral en mm<sup>3</sup> de los tumores xenógrafos de HepG2 de los ratones desnudos NCr tratados con el DPQ (color azul) y de los controles o no tratados (color rojo). Los valores fueron tomados al comienzo del tratamiento, al final y posteriormente 5 medidas más en días alternos, hasta completar un total de 7 mediciones.

Como se observa en la figura 3A, el tratamiento con el inhibidor produce una reducción en el volumen final alcanzado por los xenógrafos (394 mm<sup>3</sup>) con respecto al Grupo Control (2148 mm<sup>3</sup>), diferencias que resultaron ser estadísticamente significativas (P<0.05). Esta gran diferencia entre el volumen tumoral de ambos grupos (tratados y no tratados con DPQ) puede ser observada a nivel macroscópico (Figura 3B). El menor volumen tumoral que presentaron los xenógrafos del grupo de ratones tratados con el inhibidor de PARP hace pensar que estos tumores son menos

proliferativos y que las células tumorales pueden estar muriendo a través de la activación de los procesos apoptóticos. Por tanto, los resultados obtenidos indican el hecho de que sólo con el bloqueo de la actividad enzimática de PARP conseguimos disminuir el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo* de xenógrafos de hepatocarcinoma humano, sugiriendo que el tratamiento con inhibidores químicos de PARP puede constituir una forma novedosa de lucha contra el cáncer hepático.



---

**Figura 3.- Volumen final en mm<sup>3</sup>.** (A) Histograma del volumen final medio de los xenógrafos tumorales de HepG2 de los ratones desnudos NCr tratados con DPQ y los no tratados. Las diferencias observadas de volumen tumoral entre ambos grupos resultaron ser estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m).

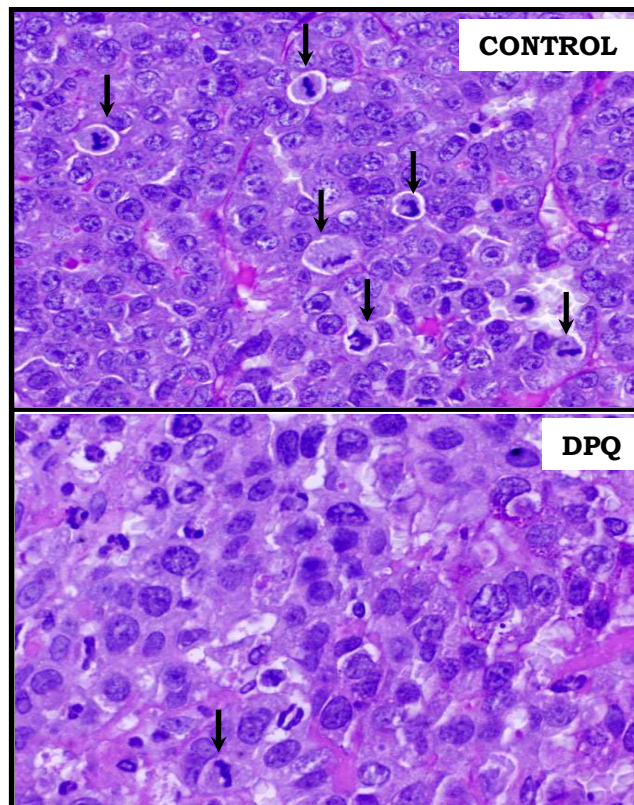
(B) Ejemplo de tumores xenógrafos de HepG2 en los ratones desnudos NCr tratados (imagen de la izquierda) y no tratados (imagen de la derecha) con el inhibidor de PARP-1, DPQ, tras un tratamiento de 4 días consecutivos a la concentración de 15 mg/kg y sacrificados a las dos semanas del comienzo del tratamiento.

---

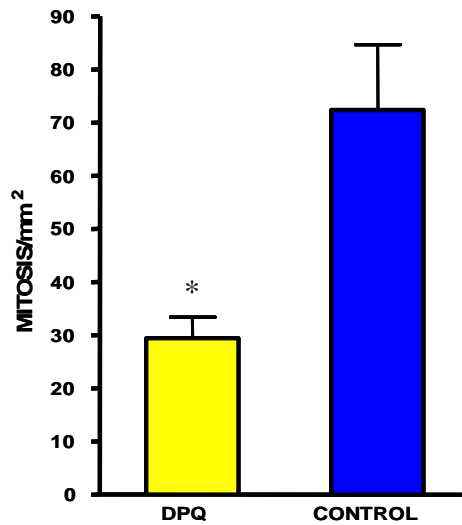
### 3.4.2. Evaluación morfológica de los xenógrafos tumorales de hepatocarcinoma humano.

Los cortes histológicos procedentes de los xenógrafos tumorales de HepG2 (material y métodos, pág. 166) se analizaron mediante la utilización de un microscopio óptico para su estudio histológico que consistió en el recuento del número de mitosis/mm<sup>2</sup>, células con morfología apoptótica/mm<sup>2</sup>. Los resultados obtenidos muestran que los xenógrafos tumorales de los ratones tratados con DPQ presentan una disminución significativa del número de mitosis (29.44) con respecto a los ratones no tratados (72.39) (P=0.028), (figura 4A).

**A**



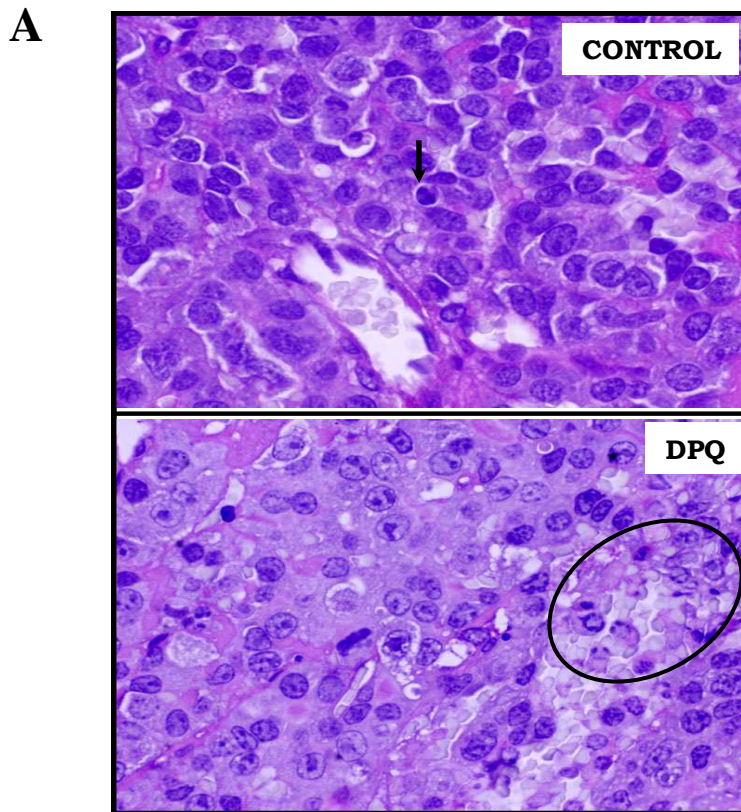
## B



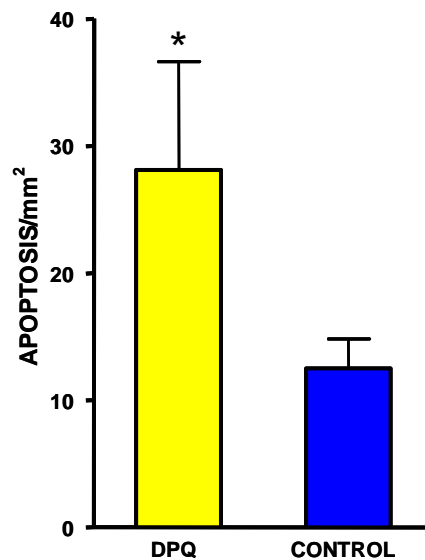
**Figura 4.- Análisis histológico de los eventos mitóticos.** (A) Ejemplo de preparaciones histológicas correspondientes a los tumores xenógrafos de HepG2 de los ratones desnudos NCr tratados con DPQ (imagen inferior) y de los controles (imagen superior) destinadas a evaluación morfológica de recuento del número de mitosis/mm<sup>2</sup>, teñidas con H&E. Puede comprobarse la disminución significativa de eventos mitóticos (señalizados mediante flechas negras) en los xenógrafos de los ratones tratados con DPQ comparándolos con los controles. (B) Análisis histológico del número de mitosis. El histograma muestra el número medio de mitosis por mm<sup>2</sup> de las secciones histológicas teñidas con H&E procedentes de los xenógrafos de los ratones desnudos NCr tratados con DPQ (N=10) (en color amarillo) y de los controles o no tratados (N=10) (en color azul). Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m). \*P<0.05 con respecto al Grupo Control, obtenido mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Por otro lado, los xenógrafos tumorales tratados con DPQ presentan un incremento en el recuento de células con morfología apoptótica (29.11) con respecto al Grupo Control (12.50), de un modo estadísticamente significativo (P=0.04), (figura 5). Estos resultados están en consonancia con los datos observados en el apartado anterior, es decir, en los xenógrafos tumorales de HepG2 de los ratones tratados con DPQ, las células tumorales presentan un número de mitosis reducido y un número de apoptosis mayor, comparado con las células tumorales de los xenógrafos tumorales de los ratones no tratados con DPQ. Por tanto, esto se traduce en una disminución del volumen tumoral como consecuencia de la reducción del crecimiento de las células tumorales y del aumento de la muerte celular, interviniendo de esta forma sobre la progresión tumoral observada en el Grupo Control.



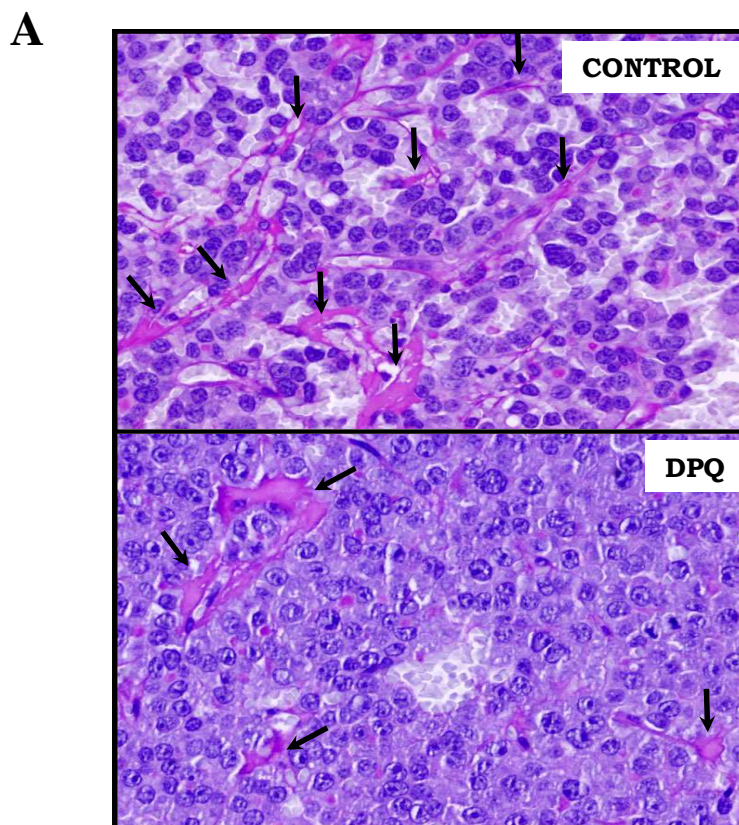


**B**

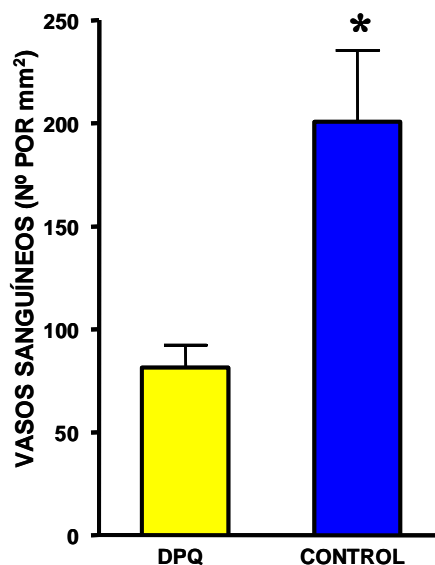


**Figura 5.- Análisis histológico de los eventos apoptóticos.** (A) Ejemplo de preparaciones histológicas correspondientes a los xenógrafos de HepG2 de los ratones desnudos NCr tratados con DPQ (imagen inferior) y de los controles (imagen superior) destinadas a evaluación morfológica de recuento de apoptosis, teñidas con H&E. Nótese el acúmulo de células apoptóticas en la imagen perteneciente a los tumores xenógrafos de los ratones tratados con DPQ (señalado con un círculo, comparándolos con los controles. (B) Análisis histológico del número de apoptosis. El histograma muestra el número medio de apoptosis por mm<sup>2</sup> de las secciones histológicas teñidas con H&E procedentes de los xenógrafos tratados con DPQ (N=10) (en color amarillo) y de los controles o no tratados (N=10) (en color azul). Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m). \*P<0.05 con respecto al Grupo Control (Mann-Whitney).

A continuación se realizó un estudio histológico encaminado a evaluar el grado de vascularización que adquirió el xenógrafo bajo las condiciones del estudio. Para ello se realizaron cortes de los bloques parafinados de los xenógrafos que se tiñeron con H&E y con la reacción de PAS (material y métodos, pág. 166). Los resultados obtenidos revelan una disminución muy significativa de la formación de vasos en los ratones tratados con DPQ ( $81.29 \pm 11.0$ ) respecto a los no tratados ( $200.64 \pm 34.7$ ), ( $P=0.007$ ), (figura 6). Estos datos muestran una gran concordancia con estudios previos de nuestro grupo (Martín-Oliva D, et al, 2004) en los que el uso de inhibidores de PARP reduce considerablemente la formación de vasos en un modelo de carcinoma epitelial. Luego, los inhibidores de PARP pueden constituir una forma novedosa e interesante de control tumoral a través de la inhibición de los procesos de angiogénesis. De esta forma, los tumores poco vascularizados presentan un aporte reducido de nutrientes, de oxígeno, factores de crecimiento, etc. Frenándose de esta manera el desarrollo del mismo y originándose zonas necróticas en el interior de masas tumorales de cierto tamaño. Además, la menor vascularización reduce la probabilidad de propagación a través de los vasos sanguíneos de células tumorales y su diseminación por el resto del organismo bloqueando la metástasis.



## B



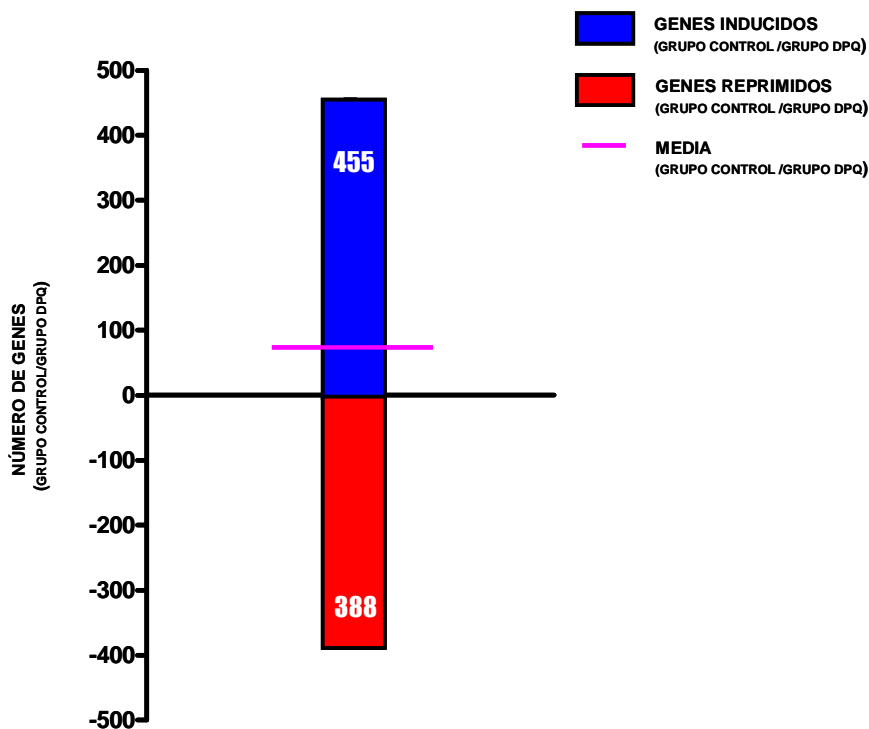
**Figura 6.- Análisis histológico de la formación de vasos sanguíneos.** (A) Ejemplo de preparaciones histológicas correspondientes a los xenógrafos de HepG2 de los ratones desnudos NCr tratados con DPQ (imagen inferior) y de los controles (imagen superior), destinadas a evaluación morfológica del recuento de vasos sanguíneos, teñidas con H&E y PAS. En las imágenes se observa la menor vascularización (señalizados mediante flechas negras) de los xenógrafos de los ratones tratados con DPQ con respecto con los controles. (B) Sobre estos cortes se realizó un recuento del número de vasos por mm<sup>2</sup>, los resultados se analizaron estadísticamente y se representaron en la presente gráfica. Grupo DPQ (N=10, amarillo) y Grupo Control (N=10, azul). Las barras de error representan el error estándar de las medias (s.e.m). \*\*P<0.01 con respecto al Grupo DPQ (Mann-Whitney).

### 3.4.3. Análisis de la expresión génica diferencial dependiente de PARP-1 en los xenógrafos tumorales de hepatocarcinoma humano

El análisis del perfil de expresión génica diferencial mediante el uso de la tecnología de los biochip de ADN puede ser llevado a cabo de un modo rápido y eficaz gracias a la posibilidad de cuantificar simultáneamente la expresión de un gran número de genes, e incluso, el genoma humano completo. En los últimos años numerosos estudios de los perfiles de expresión génica en pacientes con CHC han proporcionado una información relevante sobre los genes involucrados en la carcinogénesis hepática, aunque en la actualidad aún se desconocen las alteraciones moleculares más relevantes de las fases iniciales de la patología. Pero gracias a estas nuevas tecnologías se han podido

identificar diferentes vías de señalización alteradas en numerosos estudios proporcionando la base molecular para el tratamiento de esta neoplasia. Los análisis de la expresión génica resultan ser especialmente útiles para la clasificación de tumores y la identificación de parámetros o marcadores que serán utilizados como factores pronósticos de la enfermedad. Por tanto, es previsible que la información derivada de los estudios con microarrays se incorpore progresivamente a la práctica clínica. En investigación la tecnología de los arrays de ADN nos permite estudiar nuevas dianas terapéuticas, como es el caso de PARP-1, estudiada en este trabajo de tesis.

Tras observar el descenso acusado en el volumen del xenógrafo tumoral y del estudio morfológico del mismo, se procedió al análisis del patrón de expresión génica asociada al tratamiento con el inhibidor de PARP. Para este fin, se obtuvo ARN de los xenógrafos obtenidos y se seleccionaron 3 muestras correspondientes a masas tumorales de ratones independientes tanto del Grupo Control como del grupo tratado con DPQ. Las muestras se procesaron en Hospital Universitario Valle Hebron, Barcelona donde se utilizó el microarrays denominado “GeneChip Human Genome U133 PLUS 2,3” (HG-U133 Plus 2,3), mediante el cual se analizaron 54.675 secuencias génicas humanas. Los resultados de los niveles de expresión génica obtenidos se sometieron a un proceso de normalización y análisis. Se ha establecido como criterio de análisis de expresión génica el previamente descrito en bibliografía denominado “two fold” (Tamales et al, 2002; Herrero et al, 2003) en el cual se consideran como genes de potencial interés aquellos cuyos cambios en los niveles de expresión de ARN suponen una diferencia entre los dos grupos en los valores del logaritmo en base 2 de la absorbancia, igual o superior a 1 / igual o inferior a 1 ( $\text{two-fold} \geq 1$  o  $\text{two-fold} \leq 1$ ). Siguiendo este criterio se han encontrado un total de 843 genes con una variación de sus niveles de expresión tras el tratamiento con DPQ. Si se analizan en profundidad estos datos, se observa que en el Grupo Control, 455 genes son inducidos con respecto al Grupo Tratado y 388 genes son reprimidos (o dicho de otra forma, sobre expresados en el Grupo Tratado frente al Control) (Figura 7). Este dato nos muestra que el tratamiento con el inhibidor reduce, a nivel general, la transcripción génica, datos que confirman el papel en el control de la transcripción descrito para PARP-1, ya sea como coactivador transcripcional o favoreciendo la transcripción al modificar la estructura de la cromatina en los centros activos de transcripción.

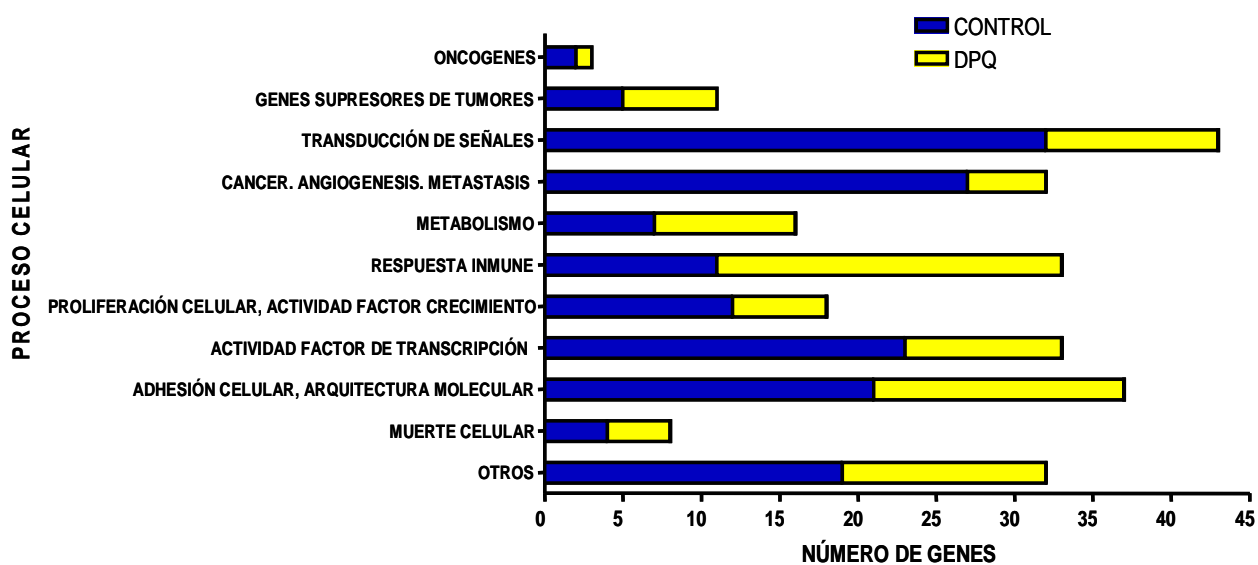


**Figura 7.- Histograma del número global de genes desregulados.** Número global de genes inducidos (455 genes, en color azul) y reprimidos (388 genes, en color rojo) al menos dos veces en los xenógrafos de HepG2 de los ratones desnudos controles respecto a los ratones tratados farmacológicamente con el inhibidor de la actividad enzimática de PARP, DPQ, usando la tecnología de los microarrays de ADN de Affymetrix.

### 3.4.4. Efectos de la inhibición de PARP-1.

Se procedió a agrupar los datos obtenidos en diferentes categorías de acuerdo a su actividad funcional (GeneOntology Biological), para un análisis más profundo y un mejor conocimiento del efecto de la inhibición de PARP sobre la transcripción así como de las posibles implicaciones sobre el proceso de hepatocarcinogénesis (Figura 8). Del análisis de los datos se desprende que existe una mayor expresión en el Grupo Control con respecto al Grupo Tratado de oncogenes, genes implicados en la transmisión de señales, factores de crecimiento, genes relacionados con angiogénesis y metástasis, de factores de transcripción. Por otro lado, existe una represión en la expresión de genes implicados en el metabolismo y en la respuesta inmune. Este perfil de expresión génica nos indica una clara predisposición al crecimiento del tumor en los ratones Control con

respecto a los Tratados y puede explicar tanto las diferencias observadas a nivel macroscópico como a nivel histológico.



**Figura 8.- Histograma del número global de genes desregulados agrupados por categorías.** Los genes que presentan unos niveles de expresión diferencial en los xenógrafos de HepG2 de los ratones controles (color azul) respecto a los tratados con DPQ (color amarillo) se representan en el histograma agrupados por categorías o familias según su función descrita en Gene Ontology Biological.

**Tabla I:** Lista de genes agrupados por familias e inducidos al menos cuatro veces en los xenógrafos, (logaritmo en base 2 de la absorbancia, igual o superior a 2 (two-fold  $\geq 2$ )) tumorales de HepG2 de los ratones desnudos NCr del grupo control no tratados con el inhibidor de PARP-1, DPQ, respecto a los ratones del grupo tratado con DPQ, usando la tecnología de los microarrays de ADN o GeneChip de Affymetrix.

<b>ONCOGENES</b>				
<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>BTC</b>	betacellulin	2,53	oncogene, angiogenesis	Integral to membrane
<b>JUND</b>	jun D proto-oncogene	2,0	Transcription factor activity	Nucleus
<b>MDM2</b>	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein	3,21	Negative regulator of basal transcription activity.	Nucleus, cytoplasm

<b>TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES</b>				
<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>ADORA3</b>	adenosine A3 receptor	2,0	A3 adenosine receptor activity, G-protein coupled	Membrane
<b>ANXA3</b>	annexin A3	2,0	signal transduction, diposphoinositol-polyphosphate diphosphatase activity	Cytoplasm
<b>ARHGEF12</b>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	2,56	GTPase activator activity	Cytoplasm Membrane
<b>ARL14</b>	ADP-ribosylation factor-like 14	2,1	Small GTPase mediated signal transduction	Intracellular
<b>CD33</b>	CD33 molecule	2,1	signal transduction, cell-cell signaling, cell adhesion	Integral to plasma membrane
<b>HUNK</b>	hormonally upregulated Neu-associated kinase	2,0	protein serine/threonine kinase activity, signal transduction	
<b>IRS2</b>	insulin receptor substrate 2	2,0	Positive regulation of cell proliferation, cell proliferation, phosphoinositide 3-kinase binding,	
<b>JAK3</b>	Janus kinase 3	2,2	Janus kinase activity, protein-tyrosine kinase activity.	Cytoskeleton, membrane
<b>MAP3K7IP2/TAB2</b>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	2,3	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade, signal transducer activity.	Cytoplasm, membrane
<b>NOSTRIN</b>	nitric oxide synthase trafficker	2,2	Signal transduction.	Cytoplasm, plasma membrane
<b>PTPRN2</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	2,66	Transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity, receptor activity, protein tyrosine phosphatase activity.	Integral to plasma membrane
<b>SPRED1</b>	sprouty-related, EVH1 domain containing 1	3,74	Inactivation of MAPK activity, regulation of signal transduction.	Membrane
<b>TMEM158</b>	transmembrane protein-158	2,57	Activation of the Ras pathway	integral to membrane

## CÁNCER, ANGIOGÉNESIS Y METÁSTASIS

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>ADAM12</b>	ADAM metallopeptidase domain 12	2,2	Metalloendopeptidase activity, cell adhesion.	plasma membrana integral to membrana
<b>ANGPTL1</b>	angiopoietin-like 1	2,0	Receptor binding, signal transduction, angiogenesis	extracellular space
<b>ANTXR1</b>	anthrax toxin receptor 1	2,0	Angiogenesis, receptor activity	membrane
<b>CASC2</b>	cancer susceptibility candidate 2	3,0	Unknown function.	
<b>EDIL3</b>	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	3	Integrin binding, cell adhesion, angiogenesis	
<b>ENG</b>	endoglin	2,0	Cell adhesion	Integral to plasma membrane
<b>EPAS1/HIF-2<math>\alpha</math></b>	endothelial PAS domain	2,0	Transcription coactivator activity, signal transducer activity, angiogenesis, cell differentiation, response to hypoxia, signal transduction	Nucleus
<b>FLT1/VEGFR1</b>	fms-related tyrosine kinase 1 / vascular endothelial growth factor	2,0	vascular endothelial growth factor receptor activity, transferase activity, receptor activity, positive regulation of cell proliferation, cell migration,	Extracellular space, integral to plasma membrane
<b>FOLH1</b>	folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	3,4	Carboxypeptidase activity	Membrane
<b>GUCY1A3</b>	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	2,0	guanylate cyclase activity, nitric oxide mediated signal transduction	Cytoplasm
<b>KISS1</b>	KiSS-1 metastasis-suppressor	2,26	Cytoskeleton organization and biogenesis, metastasis-suppressor, protein binding. Overexpression of KiSS-1 gene was frequently observed and correlated with HCC progression	
<b>MMP28</b>	matrix metallopeptidase 28	2,3	metalloendopeptidase activity, proteolysis, metastasis	Proteinaceous extracellular matrix
<b>S100A6</b>	S100 calcium binding protein A6	2,5	Growth factor activity, cell cycle, cell proliferation, metastases.	Cytoplasm Nucleus
<b>SPP1 / OPN</b>	secreted phosphoprotein 1	2,0	Cytokine activity, integrin binding, cell adhesion, cell-matrix adhesion, angiogenesis.	Extracellular space

## METABOLISMO

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>AK5</b>	adenylate kinase 5	3,5	adenylate kinase activity, ADP biosynthetic process, ATP metabolic process	cytoplasm
<b>RUNX1T1</b>	unt-related transcription factor 1; translocated to, 1	2,8	transcription factor activity, generation of precursor metabolites and energy	Nucleus



## RESPUESTA INMUNE

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>ACRBP</b>	acrosin binding protein	2,06	This protein is a member of the cancer/testis family of antigens and it is found to be immunogenic. It is detected in different tumor types such as bladder, breast, lung, liver, and colon. Molecular_function.	cellular_comp onent
<b>HLA-H</b>	hemochromatosis	2,5	Immune response, antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	MHC class I protein complex
<b>HLA-DRB4</b>	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	2,0	MHC class II receptor activity, immune response	MHC class II protein complex
<b>HRH1</b>	histamine receptor H1	2,14	Histamine receptor activity, G-protein signaling, inflammatory response, positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, signal transduction	Integral to plasma membrane
<b>MSR1</b>	macrophage scavenger receptor 1	2,3	Scavenger receptor activity.	Cytoplasm, integral to plasma membrane
<b>SERPINB4</b>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	2,0	Serine-type endopeptidase inhibitor activity, overexpressed in hepatocellular carcinoma	Cytoplasm, extracellular region

## PROLIFERACIÓN CELULAR Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>BTC</b>	betacellulin	2,53	Growth factor activity, EGF receptor binding.	Integral to membrana
<b>CDC2L5</b>	cell division cycle 2-like 5	2	Protein serine/threonine kinase activity.	
<b>GH2</b>	growth hormone 2	2,3	Hormone activity	Extracellular region
<b>HGF</b>	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	1,8	Catalytic activity, growth factor activity, protein binding, serine-type endopeptidase activity, cell proliferation	Cellular_com ponent
<b>IGFBP7</b>	insulin-like growth factor binding protein 7	2,4	Regulation of cell growth	Extracellular region
<b>PPP2R2C</b>	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, gamma isoform	2,18	Protein phosphatase type 2A regulator activity, signal transduction.	

## FACTORES Y COACTIVADORES DE TRANSCRIPCIÓN

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>EBF3</b>	early B-cell factor 3	2,52	Transcription regulator activity, DNA binding	Nucleus
<b>IRF5</b>	interferon regulatory factor 5	2,4	Transcription factor activity	Nucleus
<b>RUNX1T1</b>	unt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	2,8	transcription factor activity	Nucleus
<b>TFAP2A / AP2</b>	transcription factor <b>AP-2</b> alpha	2,1	Transcription coactivator activity, transcription factor activity	Nucleus
<b>TFAP2C</b>	transcription factor AP-2 gamma	2,44	Transcription factor activity	Nucleus
<b>TLE6</b>	transducin-like enhancer of split 6	2,43	<b>Wnt receptor signaling pathway.</b>	Nucleus
<b>TRERF1</b>	transcriptional regulating factor 1	2,8	Transcription factor activity	Nucleus
<b>ZNF268</b>	zinc finger protein 268	2,34	transcription factor activity	Nucleus

## MOLECÚLAS ESTRUCTURALES Y DE ADHESIÓN CELULAR

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>ADAM12</b>	ADAM metallopeptidase domain 12	2,2	Metalloendopeptidase activity, cell adhesion	Integral to membrana
<b>ANK3</b>	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	2,18	Structural constituent of cytoskeleton, signal transduction.	Cytoskeleton
<b>CD44</b>	CD44 molecule	2,94	Receptor activity, cell adhesion, cell-cell adhesion, cell-matrix adhesion	Integral to plasma membrana
<b>CDH5</b>	cadherin 5, type 2, VE-cadherin, vascular epithelium	2,39	Calcium ion binding, homophilic cell adhesion	Integral to membrane
<b>COL4A4</b>	collagen, type IV, alpha 4	2,47	Extracellular matrix structural constituent,	Collagen, cytoplasm
<b>LAMB4</b>	laminin, beta 4	2,9	Focal adhesion, Cell Communication	Extracellular matrix
<b>SEMA5A</b>	sema domain, seven thrombospondin repeats 5A	3,04	Cell adhesion, cell differentiation, cell-cell signaling.	Integral to membrane
<b>WASL</b>	Wiskott-Aldrich syndrome-like	2,07	Actin polymerization and/or depolymerization, cell motility.	Actin cytoskeleton, nucleus

## MUERTE CELULAR

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>BCL2L11</b>	BCL2-like 11	2,05	Positive regulation of apoptosis	Membrane
<b>PDCD4</b>	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	2,2	Apoptosis	Cytoplasm, nucleus

<b>OTRAS</b>				
<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>AQP4</b>	aquaporin 4	2,1	Porin activity, transporter activity, water channel activity	Integral to plasma membrane
<b>GPD2</b>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	2,0	Oxidoreductase activity, electron transport, glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity	Mitochondrial inner membrane
<b>GPR22</b>	G protein-coupled receptor 22	3,4	Receptor activity, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, signal transduction	Integral to plasma membrane
<b>HEMGN</b>	hemogen	3,5	Cell differentiation	Nucleoplasm
<b>RNF43</b>	ring finger protein 43	2,04	Protein binding	Integral to membrane
<b>STOML1</b>	stomatin (EPB72)-like 1	2,5	Sterol carrier activity, biological process	Integral to membrane
<b>TNNI1</b>	troponin I type 1	2,98	Actin binding, muscle contraction	Troponin complex
<b>UGCGL2</b>	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2	2,13	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase activity,	ER-Golgi, endoplasmic reticulum

**Tabla II:** Lista de genes agrupados por familias y reprimidos al menos cuatro veces (logaritmo en base 2 de la absorbancia, igual o inferior a 2 (two-fold  $\leq 2$ )) en los xenógrafos tumorales de HepG2 de los ratones desnudos NCr del grupo control no tratados con el inhibidor de PARP-1, DPQ, respecto a los ratones del grupo tratado con DPQ, usando la tecnología de los microarrays de ADN o GeneChip de Affymetrix.

<b>GENES SUPRESORES DE TUMORES</b>				
<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>EGLN1/ PHD2</b>	egl nine homolog 1	-2,64	Oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen, response to hypoxia, it's associated with HIF-1 $\alpha$	Cytosol
<b>PRTFDC1</b>	phosphoribosyl transferase domain containing 1	-2,4	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity, transferase activity, nucleoside metabolic process.	Cytoplasm
<b>UVRAG</b>	UV radiation resistance associated gene	-2,28	DNA repair.	Cytoplasm

<b>TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES</b>				
<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>Gpr103</b>	G protein-coupled receptor 103	-2,24	G-protein coupled receptor protein signaling pathway, signal transduction	Plasma membrane
<b>IRAK2</b>	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-3,27	Protein kinase activity, I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade, inflammatory response, signal transduction	Cell surface
<b>PLCE1</b>	phospholipase C, epsilon 1	-2,05	Phosphoinositide phospholipase C activity, receptor signaling protein activity, activation of MAPK activity, cell proliferation, cytoskeleton organization and biogenesis, regulation of cell growth.	Golgi apparatus Golgi membrane
<b>SPRED2</b>	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	-2,1	Inactivation of MAPK activity, regulation of signal transduction	Membrane

<b>METABOLISMO</b>				
<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>ADH6</b>	Alcohol dehydrogenase 6	-2,0	Ethanol oxidation, metabolic process, electron carrier activity, oxidoreductase activity	Cytoplasm
<b>MSRA</b>	methionine sulfoxide reductase A	-2,0	oxidoreductase activity, protein-methionine-S-oxide reductase activity, methionine metabolic process, response to oxidative stress. MSRA gene on	

			chromosome 8p might possess metastasis suppressor activity in HCC.	
<b>PLA2G4E</b>	phospholipase A2, group IVE	-2,75	calcium ion binding, hydrolase activity, phospholipase A2 activity, lipid catabolic process	Cytoplasm, membrane
<b>PRTFDC1</b>	phosphoribosyl transferase domain containing 1	-2,4	hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity, transferase activity, nucleoside metabolic process, possible tumor-suppressor gene	Cytoplasm

### RESPUESTA INMUNE

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>BRDG1 / STAP-1</b>	signal transducing adaptor family member 1	-2,6	humoral immune response, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, intracellular signaling cascade	Cytoplasm
<b>CCDC110</b>	coiled-coil domain containing 110	-3,09	Cellular and humoral immune responses	Nucleus
<b>FCGR3A</b>	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	-2,4	Receptor activity, immune response	Plasma membrane
<b>HLA-C</b>	major histocompatibility complex, class I, C	-3,0	MHC class I receptor activity, immune response	Membrane
<b>HLA-C</b>	major histocompatibility complex, class I, C	-2,8	Immune response	MHC class I protein complex
<b>HLA-DQB1</b>	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	-2,0	MHC class II receptor activity, immune	integral to membrane
<b>HLA-DRA</b>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	-3,5	MHC class II receptor activity, immune response.	MHC class II protein complex
<b>IFI6</b>	interferon, alpha-inducible protein 6	-2,0	Anti-apoptosis, immune response, negative regulation of caspase activity	Membrane, mitochondrion
<b>KIR2DL1</b>	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 1	-2,7	HLA-C specific inhibitory MHC class I receptor activity, immune response	Integral to plasma membrane
<b>LRIG1</b>	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	-2,5	Protein binding	Integral to membrane
<b>TRAT1</b>	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	-2,1	Immune response	Pasma membrane

### PROLIFERACIÓN CELULAR Y FACTORES DE CRECIMIENTO

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Fold (Control/ Tratado)</b>	<b>Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a>)</b>	<b>Componente</b>
<b>CDKN1C</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	-2,7	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity	Nucleus
<b>LTBP4</b>	latent transforming growth factor beta binding protein 4	-2,34	Growth factor activity	Cellular_component
<b>NOV</b>	nephroblastoma overexpressed gene	-2,1	Growth factor activity	Extracellular region

## FACTORES Y COACTIVADORES DE TRANSCRIPCIÓN

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>ELF2</b>	E74-like factor 2	-2,5	Transcription activator activity, transcription factor activity	Nucleus
<b>FRYL</b>	FRY-like	-2,23	Regulation of transcription, DNA-dependent, transcription	Nucleus
<b>ZHX2</b>	zinc fingers and homeoboxes 2	-2,08	Sequence-specific DNA binding, transcription factor activity, negative regulation of transcription, DNA-dependent	Nucleus

## MOLÉCULAS ESTRUCTURALES Y DE ADHESIÓN CELULAR

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>CDH17</b>	cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)	-2,7	Oligopeptide transport, calcium-dependent cell-cell adhesion, It is associated with hepatocellular carcinoma	Integral to plasma membrane
<b>MSN</b>	moesin	-2,16	Cytoskeletal protein binding	Cytoskeleton
<b>NLGN1</b>	neuroligin 1	-2,2	calcium-dependent cell-cell adhesion	Integral to plasma membrane
<b>PCDH10</b>	protocadherin 10	-2,9	Cell adhesion, calcium ion binding	Integral to membrana
<b>PCDH9</b>	protocadherin 9	-2,6	Cell adhesion, homophilic cell adhesion	Membrane

## MUERTE CELULAR

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>IFI6</b>	interferon, alpha-inducible protein 6	-2,0	Anti-apoptosis, immune response, negative regulation of caspase activity	Membrane, mitochondrion
<b>NGFR</b>	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	-2,2	Death receptor activity, nerve growth factor binding, apoptosis	Integral to plasma membrane, cytoplasm, nucleus
<b>TRAF3IP3</b>	TRAF3 interacting protein 3	-2,9	Proapoptotic effect	Integral to membrana

## OTRAS

Símbolo	Nombre del gen	Fold (Control/ Tratado)	Clasificación Funcional (Gene Ontology Biological Process; <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )	Componente
<b>ABCC12</b>	ATP-binding cassette, subfamily C member 12	-2,02	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	Integral to membrane
<b>EXOC4</b>	exocyst complex component 4	-3,30	Protein transport, vesicle docking during exocytosis	Cytoplasm
<b>IBSP</b>	integrin-binding sialoprotein	-3,45	Cell adhesion. The protein encoded by this gene is a major structural protein of the bone matrix.	Extracellular region
<b>LRRC4</b>	leucine rich repeat containing 4	-2,2	Protein binding	Membrane

<b>PARP10</b>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	-2,13	NAD+ ADP-ribosyltransferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups	Cytoplasm Nucleus
<b>SORBS2</b>	sorbin and SH3 domain containing 2	-4,69	Protein binding, cytoskeletal adaptor activity	Nucleus Actin cytoskeleton

De todos los genes analizados, podemos destacar un gran número de ellos relacionados con inflamación, cáncer, angiogénesis y metástasis, cuya expresión se encuentra reprimida en los ratones tratados con el inhibidor de PARP. Los genes más destacados se detallan a continuación:

El oncogén **MDM2** (9.25 veces inducción control con respecto a los tratados) juega un papel fundamental en el desarrollo y progresión tumoral. Este gen codifica una fosfoproteína nuclear que participa en el mecanismo de retroalimentación negativa del gen supresor de tumores p53. Cuando se produce una desregulación de este mecanismo, la sobreexpresión de Mdm2 produce la inactivación de p53 y como consecuencia de ello se pierde su capacidad como supresor tumoral, hecho que podría explicar la resistencia a la quimioterapia de muchos tumores sólidos (Rayburn et al, 2005). La desregulación e inducción de la expresión de MDM2, como ocurre en los ratones controles, tiene un importante papel en el proceso de hepatocarcinogénesis (Jablkowski et al, 2005).

Otro de los oncogenes inducidos en los ratones control es **JUND**. JunD forma parte del complejo del factor de transcripción AP1, cuya expresión está descrito, se encuentra regulada por PARP-1, protegiendo a las células de la apoptosis frente al estrés oxidativo (Gerald D. et al, 2004).

De los genes agrupados en la categoría de cáncer, angiogénesis y metástasis, podemos destacar el gen **EPAS1**. EPAS1 o HIF2-alfa es un factor de transcripción de respuesta a hipoxia, el cual en condiciones de reducción de los niveles de oxígeno es capaz de unirse y activar al factor HIF1-alfa, junto con el cual regula la expresión de genes de respuesta a hipoxia. El aumento de expresión de HIF2-alfa en hepatocarcinoma ha sido relacionado con metástasis (Bangoura G et al, 2004). En estudios recientes, HIF2-alfa ha sido propuesto como herramienta diagnóstica y posible diana en el tratamiento del CHC (Bangoura G et al, 2007). Otra de las recientes dianas terapéuticas propuestas para el tratamiento del CHC es el **VEGFR** (Pang RW et al, 2007), factor de crecimiento que participa en angiogénesis, proliferación y migración

celular. Otra familia de genes implicados en angiogénesis la forman las angiopoyetinas, las cuales son miembros de la familia de factores de crecimiento vascular, en concreto, son factores de crecimiento del endotelio vascular, y que por tanto participan en la formación de vasos sanguíneos. En nuestro estudio, hemos encontrado la **ANGPTL1** o angiopoyetina-1, inducida en los ratones controles. Las metaloproteasas también participan en la angiogénesis, mediante la remodelación de la matriz extracelular. En hepatocarcinoma, la sobreexpresión de la metaloproteasa 12 o **ADAM12**, la cual está sobreexpresada en el Grupo Control, se asocia con progresión y agresividad tumoral (Le Pabic H et al, 2003). Otros de los genes que codifican proteínas con participación en el fenómeno de angiogénesis y que se encuentran inducidos en el Grupo control son por ejemplo **EDIL3**, factor angiogénico que acelera el crecimiento tumoral y potencia la formación de vasos (Aoka Y et al, 2002); la endoglina o **ENG**, considerada como factor pronóstico de hepatocarcinoma. El gen **S100A6**, codifica una proteína de la familia S100 que participan en la progresión del ciclo celular y en diferenciación. Las alteraciones en la expresión de este gen se han relacionado con la metástasis del hepatocarcinoma, y cuya expresión está regulada por el factor de transcripción NF-k $\beta$  (Joo JH et al, 2003). El aumento de expresión del gen **SPP1** u **OPN** (osteopontina) también se relaciona con la metástasis del hepatocarcinoma. Este gen codifica la citoquina osteopontina cuya sobreexpresión se utiliza como factor pronóstico desfavorable y como marcador pronóstico de recurrencia temprana del hepatocarcinoma (Pan HW et al, 2003).

De los genes implicados en procesos de señalización celular, se han hallado una gran cantidad de genes que codifican proteínas de la familia de las MAP kinasas, cuya expresión se encuentra inducida en los ratones control. Por ejemplo, la **MAPK10**, participa en proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y la **MAP3K13**, la cual activa el factor de transcripción NF-k $\beta$ . El gen **ANXA3** o anexina A3, capaz de inducir la producción de VEGF a través del factor HIF-1, considerándose por tanto un factor angiogénico, también tiene aumentada su expresión en los ratones no tratados con DPQ. En estos ratones una gran cantidad de genes que codifican para metaloproteasas presentan aumentada su expresión, como el gen **ADAM12**, cuyo aumento de expresión también está asociado con la progresión y agresividad del hepatocarcinoma (Le Pabic H et al, 2003; Le Pabic H et al, 2005). Relacionado con la capacidad invasiva de las células de hepatocarcinoma, nos encontramos al gen **EGFR** que codifica el factor de crecimiento epidérmico y que participa proliferación,



activación de las MAP kinasas, regulación de la actividad de la óxido nítrico sintasa, en respuesta al estrés y regulación positiva de la migración celular. Mutaciones en este gen están relacionadas con el desarrollo tumoral (Soung YH et al, 2006). Otro factor de crecimiento importante es el codificado por el gen **HGF** o factor de crecimiento hepatocítico. Este factor tiene un importante papel en la carcinogénesis hepatocelular debido a su participación en la movilidad, invasión y estimulación de factores angiogénicos, como el VEGF, promoviendo la metástasis y crecimiento tumoral (Ye L et al, 2007).

Por último, dentro de la categoría de genes relacionados con la muerte celular, destacamos el gen **BCL2L10**, el cual codifica la proteína Bcl-2, inhibidora de la apoptosis, al impedir la liberación de citocromo c de la mitocondria y cuya expresión inapropiada genera proliferación y génesis tumoral, estando inducida en los ratones control.

Estos resultados están en consonancia con resultados previos descritos por Villanueva (Tabla 3) (Villanueva A. et al, 2007), en el cual se proponen un grupo de genes cuya sobreexpresión se puede asociar a la presencia de hepatocarcinoma. Algunos de estos genes han sido confirmados por nuestros resultados.

**Tabla III: Variaciones de los valores de expresión de numerosos genes asociados con el CHC (Villanueva et al, 2007).**

Función	Gen	Expresión
Vías factores de crecimiento	<i>IGF-II</i>	Incrementada
	<i>IGFR-II (M6PR)</i>	Disminuida
	<i>EGF</i>	Incrementada
	<i>EGFR</i>	Incrementada
	<i>TGF-<math>\alpha</math></i>	Incrementada
	<i>HGF</i>	Incrementada
	<i>c-MET</i>	Incrementada
	<i>PTEN</i>	Disminuida
	<i>TGF-<math>\beta</math>I</i>	Disminuida
Proliferación y diferenciación	<i><math>\beta</math>-catenina</i>	Incrementada
	<i>E-cadherina</i>	Disminuida
	<i>c-myc</i>	Incrementada
Angiogénesis	<i>VEGF</i>	Incrementada
	<i>VEGFR-2</i>	Incrementada
	<i>Angiopoietina-2</i>	Incrementada
Metástasis	<i>MMP-14</i>	Incrementada
	<i>MMP-9</i>	Incrementada
	<i>Topoisomerasa 2A</i>	Incrementada
	<i>Osteopontina</i>	Incrementada
Ciclo celular	<i>Rb</i>	Incrementada
	<i>Ciclina D1</i>	Disminuida
	<i>p53</i>	Disminuida
	<i>p16</i>	Disminuida
	<i>p27kip</i>	Disminuida
	<i>Survivina</i>	Incrementada

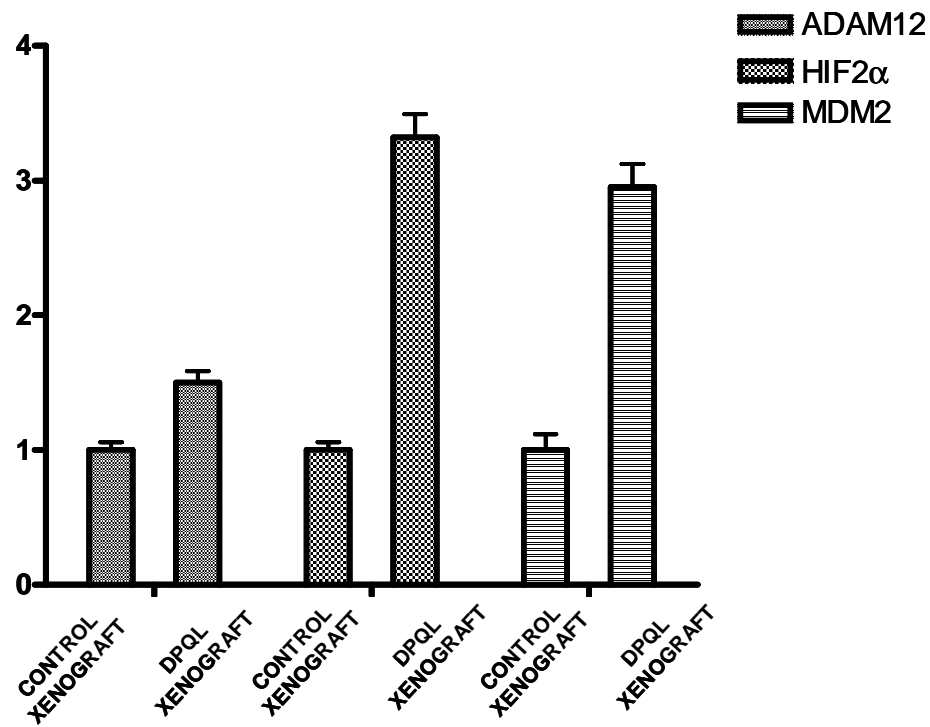
En resumen, los datos obtenidos mediante el análisis de expresión génica muestran que los inhibidores de PARP pueden ser una alternativa eficaz en el control tumoral mediante la represión de la transcripción de ciertos genes implicados en la progresión del mismo.

### 3.4.5. Estudio de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Para validar los resultados obtenidos mediante el análisis del microarray de ADN se ha utilizado la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), usando el método de comparación de las Ct (Livak et al, 2001). Los genes que se han comprobado mediante qRT-PCR han sido seleccionados por su implicación en los procesos de progresión tumoral, angiogénesis y metástasis, evidenciándose la gran implicación de PARP-1 en estos procesos. Los genes validados han sido HIF2 $\alpha$  o factor inductor de hipoxia, MDM2 y ADAM12 (figura 9). Las secuencias de los cebadores específicos para estos genes a estudiar se muestran en la tabla IV.

**Tabla IV:** Secuencias de cebadores específicos utilizados para validar los resultados de los niveles de expresión diferencial obtenidos en los microarrays de ADN de los genes seleccionados, mediante PCR en tiempo real. (S) sentido, (A) anti-sentido.

Nombre	Secuencia (5' $\longrightarrow$ 3')	Tamaño
MDM2-forward MDM2-reverse	TAA CCA CCT CAC AGA TTC CAG C TAC CTG AGT CCG ATG ATT CCT G	318 bp
ADAM12-forward ADAM12-reverse	GCA GCA GGA AGG ACT TGG AGA C CAG ATG CCA TTG TAG CAG TAG CC	394 bp
HIF2 $\alpha$ -forward HIF2 $\alpha$ -reverse	CAT TTG AGT CCT ACC TGC TGC GTA GAA GCC TGG CTC AGG TG	138 bp



**Figura 9:** Histograma que representa los diferentes valores de expresión de los genes ADAM12, HIF2 $\alpha$  y MDM2, obtenidos por PCR en tiempo real para los tumores xenógrafos de HepG2 en los ratones control y en los tratados con DPQ.

### 3.5. DISCUSIÓN

El carcinoma hepatocelular (CHC), en los últimos años, se ha convertido en un problema de salud de primer orden, debido a un dramático aumento de su incidencia en los países desarrollados, como Europa y EE.UU, a consecuencia del alto índice de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (Llovet et al 2003), considerándose al CHC, la principal causa de muerte en pacientes cirróticos. En la actualidad el gran problema lo representan precisamente los pacientes cirróticos cuyo seguimiento es vital para la detección precoz del CHC, donde alrededor del 40% de los enfermos pueden beneficiarse de terapias curativas. En los tumores avanzados, la quimioterapia sistémica es la única opción posible, con muy pocos resultados, por lo que el conocimiento de los mecanismos moleculares necesarios para la progresión y metástasis tumoral es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales para este tipo de pacientes. Mediante el uso de las modernas tecnologías de análisis de expresión génica se ha podido resolver, desde un punto de vista molecular, la compleja patogénesis del CHC. La aplicación de esta tecnología a permitido identificar subgrupos de pacientes de acuerdo a los factores etiológicos (Okabe et al, 2001), lesiones preneoplásicas tempranas (Nam et al, 2005), estados de la enfermedad (Smith et al, 2003), proporción de recurrencia tumoral (Iizuka et al 2003) y supervivencia (Lee et al, 2004). Desde un punto de vista molecular se han podido identificar las vías de señalización más relevantes implicadas en esta neoplasia que participan en diferenciación (la vía Wnt- $\beta$ -catenina, Reya et al, 2005), dependientes de receptores tirosina kinasa (la vía HGF, Roberts et al, 2005), además de un gran número de grupos de genes que pueden utilizarse con fines diagnósticos además de permitir evaluar la respuesta al tratamiento (Lee et al, 2004). Gracias al uso de estas tecnologías de análisis de los perfiles de expresión génica en pacientes de CHC, se han clasificado numerosos genes con diferentes funciones celulares que se relacionan con esta neoplasia (Tabla IV, Villanueva et al 2007).

Por tanto, el análisis del perfil de expresión génica supone una herramienta idónea para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. En la presente tesis, nosotros proponemos a la proteína PARP-1 como posible diana antitumoral frente al hepatocarcinoma. La PARP-1 o poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 es la enzima mejor caracterizada de la familia de proteínas PARPs involucradas en la poli (ADP-ribosilación) de proteínas de unión al ADN. PARP-1 participa en la respuesta celular

frente a daños en el ADN, fomentando su reparación y por tanto el mantenimiento de la integridad genómica. Por tanto, debido a la participación de PARP-1 en los mecanismos de reparación del ADN, su inhibición farmacológica ha sido objeto de numerosos estudios como una posible diana que potencia la actividad de las drogas antitumorales de que producen tanto roturas simples como dobles de cadena del ADN, impidiendo su reparación. Estos resultados han sido descritos en el capítulo I de esta tesis, donde la terapia combinada del inhibidor de PARP-1 (ANI) junto con el quimioterápico doxorubicina, potencia la muerte de líneas celulares de CHC humano *in vitro*.

Por otro lado, varios estudios han demostrado la eficacia de los inhibidores de la actividad enzimática de PARP-1, por sí solos son eficientes en la eliminación de células tumorales deficientes en BRCA-1 y BCRA-2, proteínas implicadas en la reparación del ADN por recombinación homóloga, provocando inestabilidad cromosómica, detención del ciclo celular y apoptosis de inhibir el desarrollo tumoral (Bryant et al, 2005, Farmer et al, 2005). PARP-1, además de su participación en los mecanismos anteriormente descritos, es capaz de regular la transcripción génica de numerosos genes y de factores de transcripción involucrados en la inflamación y progresión tumoral. En nuestro laboratorio, el Dr. Martín Oliva, demostró en un modelo de carcinoma epitelial, como los inhibidores de PARP afectan a la progresión tumoral al interferir en las fases iniciales del desarrollo tumoral, en la activación de factores de transcripción implicados en proliferación celular, angiogénesis e inflamación. En el capítulo II de esta tesis, en un modelo de CHC inducido por el carcinógeno químico dietilnitrosamina, se han obtenido resultados similares, donde los ratones tratados con inhibidor de PARP presentan un retraso del desarrollo tumoral debido a una disminución de la proliferación celular y a una activación deficiente del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la fase de iniciación tumoral, junto a una disminución en los niveles de expresión de ciertos marcadores tumorales.

Basándonos en estos resultados anteriores, hemos analizado la implicación de la inhibición de PARP como monoterapia en el desarrollo tumoral, estudiando los niveles de expresión génica diferencial en un modelo de ratones inmunosuprimidos xenotransplantados con la línea tumoral de CHC humano HepG2, en presencia o ausencia del inhibidor de PARP, DPQ. El grupo de ratones tratados con el DPQ presentaron una reducción de la progresión tumoral con respecto al Grupo Control, con una disminución significativa del índice mitótico y de la formación de vasos sanguíneos. En cambio, en el grupo de ratones donde la PARP-1 no fue inhibida

farmacológicamente, los tumores aumentaron significativamente su volumen debido a un mayor índice de mitosis y de formación de vasos sanguíneos, además de una disminución del número de eventos apoptóticos. El análisis de expresión génica diferencial ha revelado la gran importancia que tiene la actividad enzimática de PARP-1 en la progresión e invasión tumoral además de evidenciar su papel en la regulación de la transcripción génica. Los resultados obtenidos demuestran que los tumores de los ratones tratados con DPQ presentan una disminución de la progresión tumoral y esta puede estar asociada a una represión de la expresión de oncogenes (JUND, MDM2), de las vías de señalización de proliferación celular (IRS2, MAPK), de factores de crecimiento (HGF, IGFBP7), de factores de transcripción (TFAP2A, TFAP2C), de moléculas de adhesión celular (ADAM12, ANK3) y de genes relacionados con angiogénesis y metástasis (VEGFR, OPN, HIF2-alfa) junto con un aumento de la expresión de genes supresores de tumores (UVRAG, EGLN1).

Recapitulando todos los resultados obtenidos en esta tesis, la propuesta de PARP-1 como nueva diana en el tratamiento del CHC, abre un camino esperanzador como una posible opción terapéutica para los pacientes con tumores en estado avanzado. En este tipo de pacientes, la quimioterapia presenta un alto índice de toxicidad con un índice elevado de muertes asociadas a esta terapia. El uso de inhibidores de PARP-1 podría frenar la progresión del tumor impidiendo el proceso de metástasis, tan común es esta neoplasia, y se evitaría la toxicidad secundaria de las drogas antitumorales utilizadas actualmente. Por otro lado, dichos inhibidores pueden ser de gran utilidad en el tratamiento de enfermos en los primeros estadios del cáncer hepático, controlando la proliferación de las células tumorales mediante el control de ciertos factores de crecimiento (HGF, PDGF, etc.), bloqueando la expresión de ciertos oncogenes (JUND, MDM) y frenando la vascularización de dichos tumores emergentes, reduciendo de esta manera el flujo de nutrientes y oxígeno al interior de dichas masas tumorales.



## **BIBLIOGRAFÍA**





Aoka Y, Johnson FL, Penta K, et al. The embryonic angiogenic factor Dell accelerates tumor growth by enhancing vascular formation. *Microvasc Res* 2002; 64(1):148-61.

Bangoura G, Liu ZS, QuianQ, et al. Prognostic significance of HIF-2 $\alpha$ /EPAS1 expression in hepatocellular carcinoma. *World Journal Gastroenterology* 2007; 13(23):3176-3182.

Bangoura G, Yang LY, Huang GW, et al. Expression of HIF-2 $\alpha$ /EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 15; 10(4):525-30.

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; 434:913-916.

Calabrese CR, Batey MA, Thomas HD, et al. Identification of potent nontoxic poly (ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotential and pharmacological studies. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7): 2711-8.

Delaney CA, Wang LZ, Kyle S, et al. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly (adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7): 2860-7.

Di Paola R, Mazzon E, Xu W, et al. Treatment with PARP-1 inhibitors, GPI 15427 or GPI 16539, ameliorates intestinal damage in rat models of colitis and shock. *Eur J Pharmacol* 2005; 527:163-171.

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434:917-921.

Gao W, Lam W, Zhong S, et al. Novel mode of action of tylophorine analogs as antitumor compounds. *Cancer Research* 2004; 64:678-688.

Gerald D, Berra E, Frapart YM, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004; 17; 118(6):781-94.

Graziani G, Battaini F, Zhang J. PARP-1 inhibition to treat cancer, ischemia, inflammation. *Pharmacol Res* 2005; 52:1-4.

Herrero J, et al. GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data análisis. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3461-3467.

Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, et al. Olinucleotide microarray for presiction of early intrahepatic recurrente of hepatocellular carcinoma alter curative resection. *Lancet* 2003; 361:923-929.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4:249-264.

Jablkowski M, Bocian A, Bialkowska J et al. A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2005; 24(1):117-25.

Joo JH, Kim JW, Lee Y, et al. Involvement of NF-kappaB in the regulation of S100A6 gene expression in human hepatoblastoma cell line HepG2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 25; 307(2):274-80.

Kaplan J, O'Connor M, Hake PW, Zingarelli B. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase ameliorate myocardial reperfusion injury by modulation of activator protein-1 and neutrophil infiltration. *Shock* 2005; 23:233-238.

Le Pabic H, Bonnier D, Wewer UM, et al. ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. *Hepatology* 2003; 37(5):1056-66.

Le Pabic H, L'Helgoualc'h A, Coutant A, et al. Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2005; 43(6):1038-44.

Lee JS, Chu IS, Heo J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004; 40:667-76.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C (T)). *Methods* 2001; 25:402-8.

Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 2003; 37:429-42.

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907-17.

Martín-Oliva D, Aquilar-Quesada R, O'Valle F, et al. Inhibition of Poly (ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66(11): 5744-5756.

Martín-Oliva D, O'Valle F, Muñoz-Gómez JA, et al. Crosstalk between PARP-1 and NF-κB modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene* 2004; 23:5275-5283.

Mendeleyev J, Kirsten E, Hakam A, et al. Potential chemotherapeutic activity of 4-iodo-3-nitrobenzamide. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(5): 705-14.

Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D, Aguilar Quesada R, et al. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J.*, 2005; 386:119-125.

Nam SW, Park JY, Ramasamy A, et al. Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology* 2005; 42:809-818.

Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression *Cancer Res* 2001; 61:2129-2137.

Pan HW, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98:119-127.

Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology* 2007; 72(1):30-44.

Rayburn E, Zhang R, He J, Wang H. MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5(1):27-41.

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells cancer. *Nature* 2005; 434:483-50.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60.

Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis.* 2005; 25:212-25.

Ruf A, Mennissier de Murcia J, de Murcia G et al. Structure of the catalytic fragment of poly (ADP-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15):7481-5.

Schreiber V, Hunting D, Trucco C, et al. A dominant-negative mutant of human poly (ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DAN damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(11): 4753-7.

Smith MW, Yue ZN, Geiss GK, et al. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:859-864.

Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer* 2006; 15; 118(6):1426-9.

Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A. Poly(ADP-ribose) polymerase: the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 2005; 31:149-167.

Tamames J, et al. Bioinformatics methods for the analysis of expression arrays: data clustering and information extraction. *J Biotechnol* 2002;98:269-283.

Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002; 31:339-46.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002; 3(7): 34.1-34.11.

Villanueva A, Newell P, Chiang D, et al. Genes and signalling pathways involved in the pathogenesis of HCC. *Semin Liver Dis.* 2007; 27:55-76.

Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:375-429.

Virag L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3:209-214.

Weltin D, Marchal J, Dufour P, et al. Effect of 6(5H)-phenanthridinone, an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, on cultured tumor cells. *Oncol Res* 1994; 6(9): 399-403.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22:130-1, 134-8.

Ye L, Lewis-Russell JM, Davies G, et al. Hepatocyte growth factor up-regulates the expression of the bone morphogenetic protein (BMP) receptors, BMPR-IB and BMPR-II, in human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2007; 30(2):521-9.

## **CONCLUSIONES**





El análisis y discusión crítica del conjunto de observaciones y resultados experimentales contenidos en esta memoria nos ha permitido formular las siguientes conclusiones:

## **CAPÍTULO I:**

**PRIMERA:** El tratamiento de líneas celulares de hepatocarcinoma humano con el inhibidor de la topoisomerasa II, doxorubicina, produce la activación de PARP-1.

**SEGUNDA:** La supresión de la actividad de PARP mediante la utilización de inhibidores químicos, aumenta el efecto citotóxico producido por dosis farmacológicas de doxorubicina en el modelo tumoral constituido por células de hepatocarcinoma humano.

**TERCERA:** El efecto potenciador del quimioterapéutico doxorubicina en la terapia combinada con inhibidores de PARP no se produce en el modelo no tumoral constituido por hepatocitos no transformados.

**CUARTA:** La inhibición de la actividad de PARP provoca deficiencias en los procesos de reparación de daños en el ADN producidos por el tratamiento con el agente antitumoral. La acumulación de roturas en el genoma que permanecen sin reparar es la causa más probable de la quimio-sensibilización ejercida por el inhibidor de PARP tras el tratamiento con doxorubicina.

## **CAPÍTULO II:**

**QUINTA:** El tratamiento farmacológico con inhibidores de PARP disminuye la proliferación de los hepatocitos en un modelo animal sometido a un protocolo de hepatocarcinogénesis.

**SEXTA:** En las etapas tempranas de la hepatocarcinogénesis el uso de inhibidores de PARP ocasionan un retraso en el desarrollo tumoral debido a la

deficiente activación del factor de transcripción NF-kB y a la represión de la expresión génica de determinados marcadores tumorales.

### **CAPÍTULO III:**

**SÉPTIMA:** Los hepatocarcinomas xenotrasplantados en un modelo de ratones desnudos reducen significativamente su volumen tumoral en presencia del inhibidor de PARP.

**OCTAVA:** El análisis del perfil de expresión génica diferencial en los hepatocarcinomas xenotrasplantados en un modelo de ratones desnudos en presencia o ausencia del inhibidor farmacológico de PARP, nos ha permitido demostrar que la expresión génica se encuentra alterada. De todos los genes analizados, 388 se encuentran inducidos y 455 reprimidos en los ratones tratados con el inhibidor de PARP comparados con los no tratados.

**NOVENA:** El estudio de la expresión génica nos permite demostrar que PARP regula la transcripción génica de un número importante de genes implicados con oncogenes, metabolismo, respuesta inmune, transcripción de señales, factores de crecimiento, cáncer, angiogénesis y metástasis.

**DÉCIMA:** La inhibición farmacológica de PARP en las etapas de progresión y metástasis del hepatocarcinoma produce la inhibición del fenómeno de angiogénesis.

**CONCLUSIÓN FINAL:** El uso de inhibidores de PARP resultan idóneos en la terapia antineoplásica frente al hepatocarcinoma por: 1) potenciar el efecto del quimioterapéutico doxorubicina en la terapia combinada; 2) prevenir el fenómeno oncogénico retardando la iniciación de la hepatocarcinogénesis; 3) inhibir la expresión génica de genes responsables de la progresión y angiogénesis tumoral, y como consecuencia, inhibiendo la metástasis tumoral tan frecuente en el hepatocarcinoma.

## **ABREVIATURAS**



**2-ME:** 2-Mercaptoetanol  
**3-ABA:** 3-Aminobenzamida  
**3-MA:** 3- metil adenina  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**AFP:**  $\alpha$ -fetoproteína  
**AIF:** Factor inductor de apoptosis (*Apoptosis Inducing Factor*)  
**ANI:** 4-amino-1,8-naftalimida, Inhibidor de PARP  
**AP-1:** *Activator protein 1*  
**APC:** tumor-suppressor adenomatous polyposis coli  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNm:** Ácido ácido mensajero  
**ATP:** Adenosina 5'-trifosfato  
**BER:** *Base Escisión Repair*  
**BH:** Dominio de homología de las proteínas de la familia de Bcl-2 (*Bcl-2 Homology*)  
**BRCT:** *BRCA1 C-terminus*  
**BrdU:** Bromodesoxiuridina  
**cDNA:** ADN complementario  
**CHC:** carcinoma hepatocelular  
**DBD:** *DNA binding domain*  
**DEN:** N,N-dietilnitrosamina  
**DMBA:** 7,12-dimetilbenzo[a]-antraceno)  
**DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle's medium*  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**dNTP:** Desoxinucleótido trifosfato  
**DOXO:** Doxorrubicina  
**DPQ:** 3,4-Dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona  
**DTT:** Ditioneitol  
**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético  
**EGFR:** factor de crecimiento epidermal  
**ERK:** Quinasas activadas por señales extracelulares  
**FBS:** Suero bovino fetal (*Foetal bovine serum*)  
**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína  
**GSK3 $\beta$ :** glycogen cintaza kinasasa 3 $\beta$   
**HEPES:** N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(1-ácido etanofulfónico)

**HGF:** factor de crecimiento hepatocitario  
**HMG:** hibridación genómica comparativa  
**HMG:** *High Mobility Group proteins*  
**HRP:** Peroxidasa del rábano  
**HTH:** Motivos *helix Turn Helix*  
**IC<sub>50</sub>:** *Inhibitory concentration 50%*  
**IGFR:** factor de crecimiento insulín-like  
**JNK:** c-Jun N-terminal quinasa  
**LD<sub>50</sub>:** *Lethal doses 50%*  
**LOH:** pérdida de heterocigocidad  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**LZ:** *Leucine Zipper* (cremallera de leucina)  
**MAPK:** Quinasas activadas por mitógenos  
**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido  
**NF-κB:** *nuclear factor κB*  
**NLS:** Señal de localización nuclear  
**Oct-1:** Factor de transcripción octámero  
**PAR:** Polímero de poli (ADP-ribosa)  
**PARG:** Poli-ADP-ribosa glicohidrolasa  
**PARP:** Poli-ADP-ribosa polimerasa  
**PAS:** *Periodic Acid Schiff*  
**pb:** Pares de bases  
**PBS :** Solución tampón fosfato  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**PI3K :** Fosfatidil Inositol-3 quinasa  
**PI3K:** fosfatidilinositol 3 quinasa  
**PIP3:** fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato  
**PS:** Fosfatidil serina  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**RT-PCR:** PCR en tiempo real  
**SDS:** Sodio dodecil sulfato  
**SSBR:** *Single Strand Break Repair*  
**SSC:** *Saline-Sodium Citrate*

**TEF-1:** *Transcription Enhancer Factor-1*  
**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina  
**TMZ:** temozolomida  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**UV/UVA:** Radiación ultravioleta  
**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular  
**VHB:** virus de la hepatitis B  
**VHC:** virus de la hepatitis C  
**XRCC1:** *X-ray cross complementing factor 1*  
**YY-1:** Ying-Yang-1





## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**



Research article

Open Access

## Interaction between ATM and PARP-I in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition

Rocío Aguilar-Quesada<sup>1</sup>, José Antonio Muñoz-Gámez<sup>1,2</sup>, David Martín-Oliva<sup>1,3</sup>, Andreína Peralta<sup>1</sup>, Ma Teresa Valenzuela<sup>2</sup>, Rubén Martínez-Romero<sup>1</sup>, Rosa Quiles-Pérez<sup>4</sup>, Josiane Menissier-de Murcia<sup>5</sup>, Gilbert de Murcia<sup>5</sup>, Mariano Ruiz de Almodóvar<sup>2</sup> and F Javier Oliver\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Instituto López Neyra de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC. Granada, Spain, <sup>2</sup>IBIMER, Universidad de Granada, Granada, Spain, <sup>3</sup>Dept. Biología Celular, Universidad de Granada, Granada, Spain, <sup>4</sup>Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain and <sup>5</sup>Département "Intégrité du Génome" de l'UMR 7175 École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Strasbourg, France

Email: Rocío Aguilar-Quesada - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); José Antonio Muñoz-Gámez - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); David Martín-Oliva - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); Andreína Peralta - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); Ma Teresa Valenzuela - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); Rubén Martínez-Romero - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); Rosa Quiles-Pérez - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); Josiane Menissier-de Murcia - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); Gilbert de Murcia - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); Mariano Ruiz de Almodóvar - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es); F Javier Oliver\* - [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es)

\* Corresponding author

Published: 25 April 2007

Received: 27 October 2006

BMC Molecular Biology 2007, 8:29 doi:10.1186/1471-2199-8-29

Accepted: 25 April 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/8/29>

© 2007 Aguilar-Quesada et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

ATM and PARP-I are two of the most important players in the cell's response to DNA damage. PARP-I and ATM recognize and bound to both single and double strand DNA breaks in response to different triggers. Here we report that ATM and PARP-I form a molecular complex *in vivo* in undamaged cells and this association increases after  $\gamma$ -irradiation. ATM is also modified by PARP-I during DNA damage. We have also evaluated the impact of PARP-I absence or inhibition on ATM-kinase activity and have found that while PARP-I deficient cells display a defective ATM-kinase activity and reduced  $\gamma$ -H2AX foci formation in response to  $\gamma$ -irradiation, PARP inhibition on itself is able to activate ATM-kinase. PARP inhibition induced  $\gamma$  H2AX foci accumulation, in an ATM-dependent manner. Inhibition of PARP also induces DNA double strand breaks which were dependent on the presence of ATM. As consequence ATM deficient cells display an increased sensitivity to PARP inhibition. In summary our results show that while PARP-I is needed in the response of ATM to gamma irradiation, the inhibition of PARP induces DNA double strand breaks (which are resolved in and ATM-dependent pathway) and activates ATM kinase.

### Background

The ATM protein kinase is centrally involved in the cellular response to ionizing radiation (IR) and other DNA double-strand-break-inducing insults. In persons affected with ataxia-telangiectasia (A-T), associated mutations in the ataxia-telangiectasia mutated (*atm*) gene render cells unable to cope with the genotoxic stresses from ionizing

radiation and oxidative damage, thus resulting in a higher concentration of unrepaired DNA. Functional inactivation of the ATM gene product and *Atm*-null mice, which were created by disrupting the *Atm* locus, recapitulate the human A-T phenotype and display growth retardation, mild neurological dysfunction, male and female infertile-

ity, extreme predisposition to thymic lymphomas, and acute sensitivity to ionizing radiation [1-3].

ATM, the product of the ATM gene, is a member of a family of large proteins found in various organisms that share a COOH-terminal PI3 kinase-like domain. ATM has serine/threonine protein kinase activity and mediates the activation of multiple signal transduction pathways reviewed in [4-6].

Although it has been well established that IR exposure activates the ATM kinase domain, the actual mechanism by which ATM responds to damaged DNA has remained enigmatic until recently. Initial evidences indicated that ATM activation might involve autophosphorylation. A breakthrough in our understanding of this process came in a landmark publication by Bakkenist and Kastan [7]. They found that ATM molecules are inactive in undamaged cells, being held as dimers or higher-order multimers. In this configuration, the kinase domain of each molecule is blocked by the FAT domain of the other. Following DNA damage, each ATM molecule phosphorylates the other on a serine residue at position 1981 within the FAT domain, a phosphorylation that releases the two molecules from each other's grip, turning them into fully active monomers.

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is a nuclear enzyme which is activated in response to genotoxic insults by binding damaged DNA and attaching polymers of ADP-ribose to nuclear proteins at the expense of its substrate NAD<sup>+</sup>. The protein respond to DNA damage by transferring 50 to 200 molecules of ADP-ribose to various nuclear proteins, including transcription factors, histones and PARP-1 itself [8]. This poly(ADP-ribosyl)ation activity of PARP-1 appears to be important for maintaining genomic integrity [9] and it has been associated with longevity. Furthermore, PARP-1 is activated by agents infringing single stranded DNA damage such as alkylating agents, ionizing radiation, and oxidative damage.

A function of PARP-1 as a nick sensor has been proposed [10]. Its rapid activation upon DNA damage may result in poly (ADP-ribosyl)ation of key enzymes such as transducers of DNA damage, or alternatively, PARP-1 automodification could result in the recruitment of transducers to the damaged site. In this regard, a link between ATM and PARP-1 is supported by recent findings. One of these studies has demonstrated a sustained PARP-1 activation in ATM<sup>-/-</sup> cells due to the persistence of DNA damage [11,12]. Moreover, Menissier-de Murcia *et al.* [12], have reported that ATM and PARP-1 double deficient mice have a severe synergistic phenotypes leading to early embryonic lethality due to the effects of these proteins on signalling DNA damage and/or on distinct pathways of

DNA repair. Furthermore, a recent study has shown that *in vitro*, PARP-1 inhibited the activation a subset of ATM substrates such as phosphorylation of p53 on serine 15 [13].

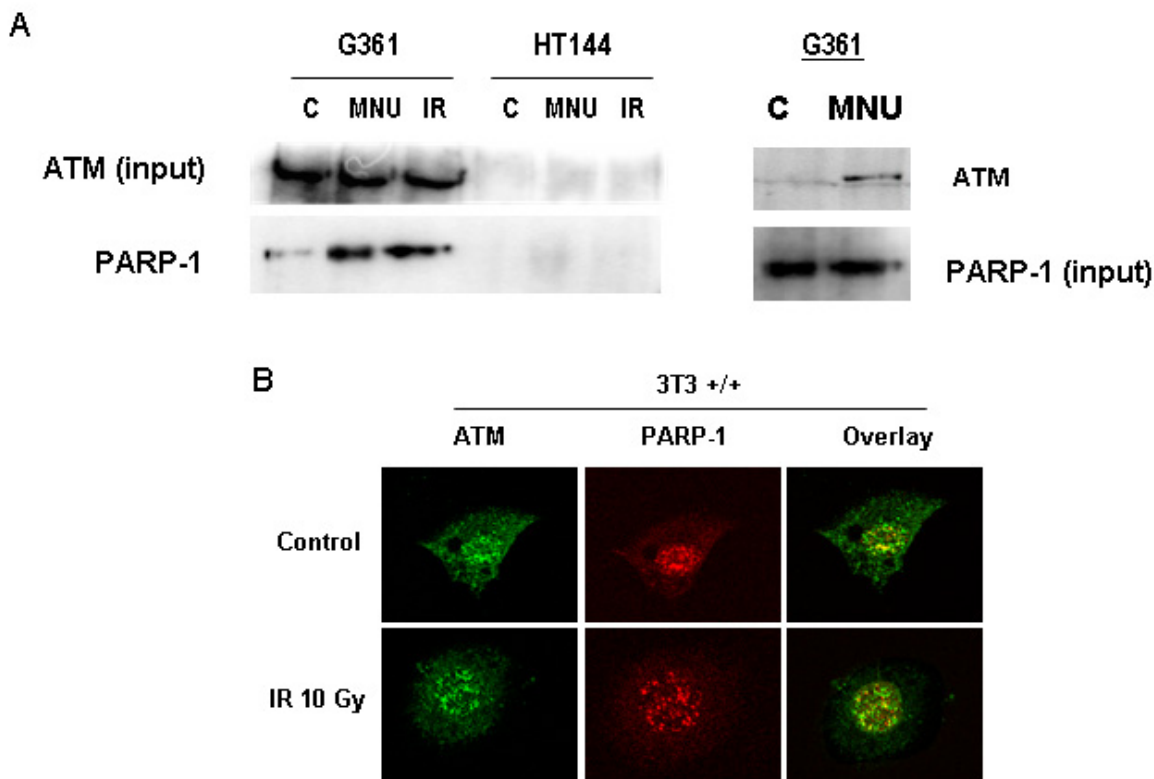
The aim of this study has been to elucidate the interaction between PARP-1 and ATM and how this partnership is involved in regulation of DNA repair pathways. We present evidences showing a physical association between ATM and PARP-1 in response to DNA damage as well as a poly (ADP-ribosyl)ation of ATM. The biological consequence of this interaction is a diminished activation of ATM-kinase in the absence of PARP-1. Surprisingly, preventing poly(ADP-ribosyl)ation with PARP inhibitors results in an increased constitutive ATM-kinase related to the PARP inhibitor's ability to induce DNA double strand breaks (DSBs) which were resolved in an ATM-dependent manner.

## Results

### **PARP-1 interacts with ATM *in vivo* and ATM is modified by poly(ADP-ribosyl)ation**

Previous studies have shown that PARP-1 and ATM double deficient mice are embryonic lethal very early during development, suggesting that the two proteins together are needed for the every day life of the animal [12]. In the present study our principal aim was to test whether these two proteins interact (both physical and functionally) in the response to  $\gamma$ -radiation. Figure 1A shows an ATM co-immunoprecipitation study using G361 cells (HT44, an ATM deficient cell line, was used as a negative control). ATM complexes were immunoprecipitated from nuclear extracts using an antibody against ATM (SYR 10G3/1) and the presence of PARP-1 was tested by immunoblot analysis using an anti-PARP-1 antibody. ATM form a tight complex with PARP-1 (1A, upper panels). Reciprocal immunoprecipitation experiments confirmed the previous observation (not shown). Interestingly, this complex was much more evident after DNA damage infringed with either the single alkylating agent N-methyl-N-nitrosourea (MNU, 2 mM) or 10 Gy of  $\gamma$ -irradiation. The interaction was direct and not mediated by DNA since the presence of ethidium bromide was not effective in abolishing the formation of the complex and the specificity of the pull-down was confirmed by the lack of co-immunoprecipitation using an IgG control (not shown). These results were confirmed by co-localisation studies with confocal microscopy, where after  $\gamma$ -irradiation the number of co-localised ATM/PARP-1 foci (yellow) increased respect to untreated cells. Both ATM and PARP-1 are localised in foci after DNA damage.

In order to check whether ATM was modified or not by PARP-1 following DNA damage, the modification of ATM by PARP-1 was analysed in a time course experiment using



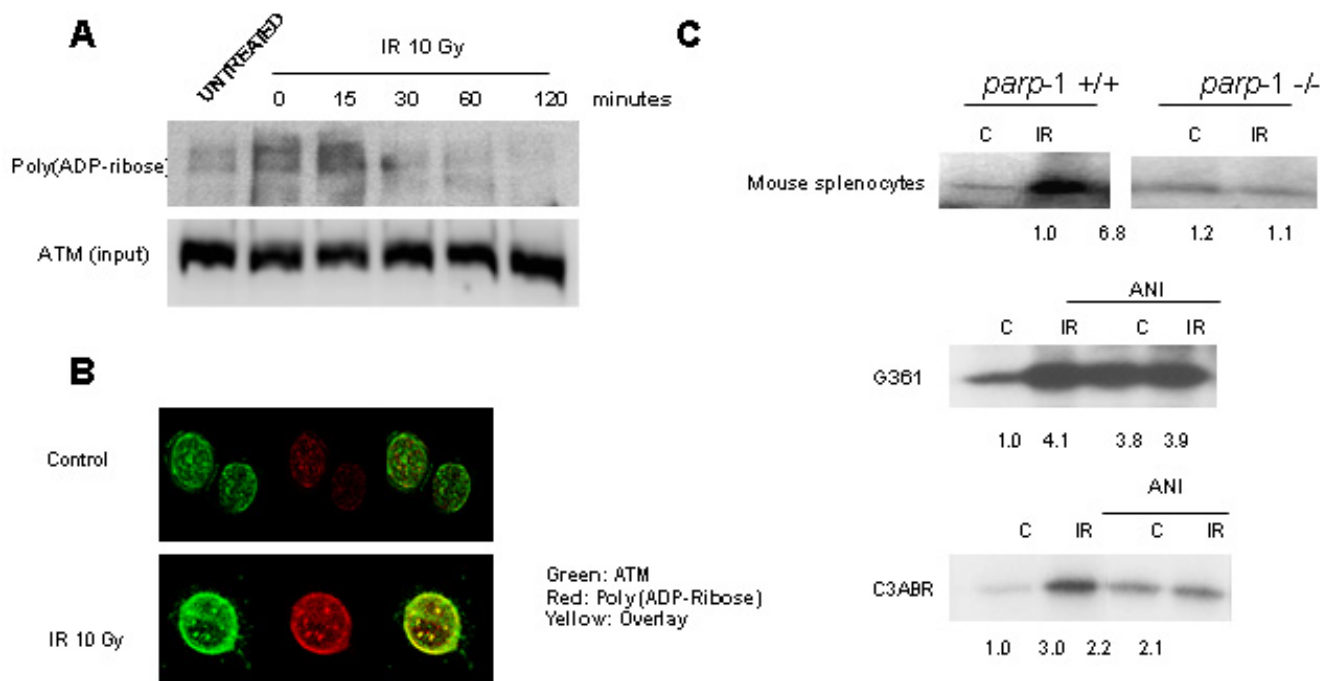
**Figure 1**

ATM form a complex with PARP-1 in DNA that is much more evident after treatment with DNA damaging agents. A: ATM was immunoprecipitated in human melanoma cell lines G361 and HT144 (ATM deficient) as explained under methods and the presence of PARP-1 was tested by immunoblot analysis. Cells were treated with 10 Gy IR or 2 mM MNU for 30 min. In the left panel, PARP-1 was immunoprecipitated from G361 cells treated or not with 2 mM MNU and western blot was performed to reveal ATM. B: Double indirect immunofluorescence in 3T3 fibroblasts (*parp-1*+/+) of PARP-1 (red signal) and ATM (green). Yellow signal correspond with co-localization of both proteins.

the same antibody to immunoprecipitate ATM (figure 2A). ATM is, indeed, modified by poly (ADP-rybosil)ation and this modification increases during DNA damage, reaching a maximum after 30 min and then start to decrease. Polymer signal correspond to ATM molecular weight. Again, confocal microscopy confirmed the co-localisation of ATM and poly (ADP) ribose after ionizing radiation (figure 2B). In conclusion, these results are the first indication that ATM is physically associated to PARP-1 and is a substrate for this enzyme, co-localizing in the same foci after DNA damage.

**PARP-1 is needed for optimal activation of ATM**

One key question derived from the previous results concern the functional consequences of the interaction between PARP-1 and ATM and between poly (ADP-rybosil)ation and ATM on ATM activation. To address this question we have measured ATM kinase activity in wild type and PARP-1 deficient cells and in the presence and absence of the PARP inhibitor 4-amino,1-8,naphtalimide (ANI). Splenocytes from *parp-1*+/+ and *parp-1*-/- mice or G361 cells (a human melanoma cell line) were irradiated at 10 Gy. ATM was immunoprecipitated 30 minutes after the IR treatment and the ATM kinase assay performed (figure 2C). In these conditions ATM was strongly activated in response to ionizing radiation in *parp-1*+/+ splenocytes



**Figure 2**  
ATM is modified by poly(ADP)ribose. A: ATM was immunoprecipitated in G361 cells and the presence of poly(ADP ribose) was tested by immunoblot analysis in a time course, reaching a maximum after 15 min of IR (10 Gy). Equal loading was normalized by the input of ATM. B: Double indirect immunofluorescence in 3T3 fibroblasts (*parp-1 +/+*) of poly(ADP-ribose) (red signal) and ATM (green). Yellow signal correspond with poly(ADP-ribosylation) of ATM. C: PARP-1 is needed for optimal activation of ATM. In vitro ATM-kinase assay. ATM activity increases after  $\gamma$ -irradiation in wild-type mouse splenocytes, but not in *parp-1* knockout mouse splenocytes, where ATM is activated in control (upper panels). In G361 cells and C3ABR (middle and lower panel) irradiated with or without ANI co-treatment, ATM kinase activity increases after  $\gamma$ -irradiation and/or PARP inhibitors. Equal loading was checked with coomassie blue staining. Normalized signal respect to coomassie blue is shown below. Results are representative of three independent experiments.

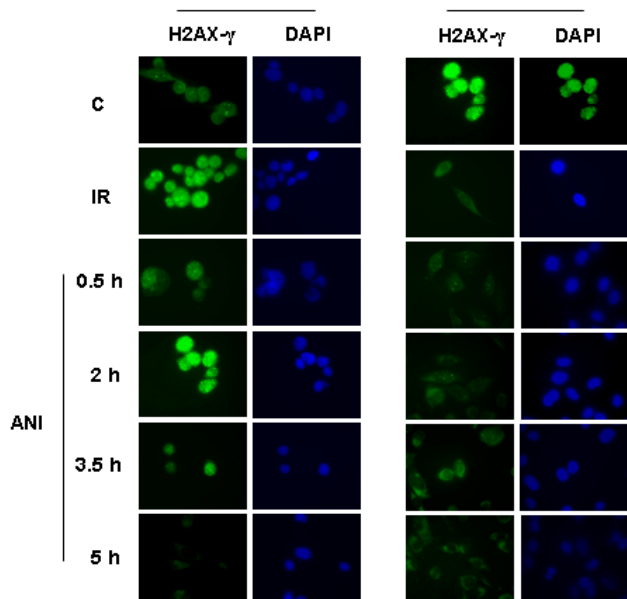
but not in *parp-1*<sup>-/-</sup> (Figure 3A). In G361 and C3ABR cells IR also activates ATM kinase but this increase was not observed if prior to IR there was a pre-incubation with the PARP inhibitor, ANI (figure 2C, middle and lower panel); surprisingly, the simple presence of the PARP inhibitor was able to activate ATM kinase.

**PARP inhibitors promote ATM activation through induction of DSBs**

To gain insight about the increased basal ATM-kinase activity after the inhibition of PARP-1 with ANI (figure 2C), we performed an indirect immunofluorescence against H2AX in its phosphorylated form, after the incubation with the PARP inhibitor in order to detect any DNA damage response. ATM wild type and deficient cells (G361 and HT144 respectively) were incubated with ANI at different times. Remarkably the sole fact of the incubation with ANI was able to elicits H2AX phosphorylation in wild type but not in ATM deficient cells. This effect was transient and reached a peak in 2 hours, declining after-

wards (figure 3).  $\gamma$ -Irradiation was used as positive internal control (figure 3, upper panels). Previous results from our group have shown that PARP-1 null cells have a deficient p53 ser15 phosphorylation in response to ionising radiation [15], confirming with a different ATM substrate that ATM activation is compromised in the absence of PARP-1.

Recent results have shown that inhibition of PARP leads to stalled replication fork and the formation of DNA double strand breaks that are resolved by homologous recombination [17]. In order to test this possibility in our system we performed neutral comet assay to detect double strand breaks (DSB). DSB were produced by treatment with the PARP inhibitor in both ATM proficient (G361) and deficient (HT144) cells but only ATM wild type cells were able to completely resolve double strand breaks (figure 4A). PARP inhibition activates ATM through the induction of DSBs which are repaired by HR; since ATM deficient cells were less efficient in resolving DNA strand breaks that



**Figure 3**

ATM is activated by PARP inhibitors. Immunostaining for  $\gamma$ -H2AX in G361 (ATM wild type) and HT144 (ATM deficient) cells exposed to  $\gamma$ -irradiation (positive control) or ANI (time course after drug exposure). H2AX (green signal) is phosphorylated by ATM after ANI treatment in absence of  $\gamma$ -irradiation in G361 cells (ATM-proficient). DAPI is shown in blue and both views are in coincidence.

result from PARP inhibition we next examined their sensitivity to ANI in the presence and absence of IR. Results in figure 4B clearly show that ATM deficient cells are much more sensitive to PARP inhibition with or without further DNA damage.

## Discussion

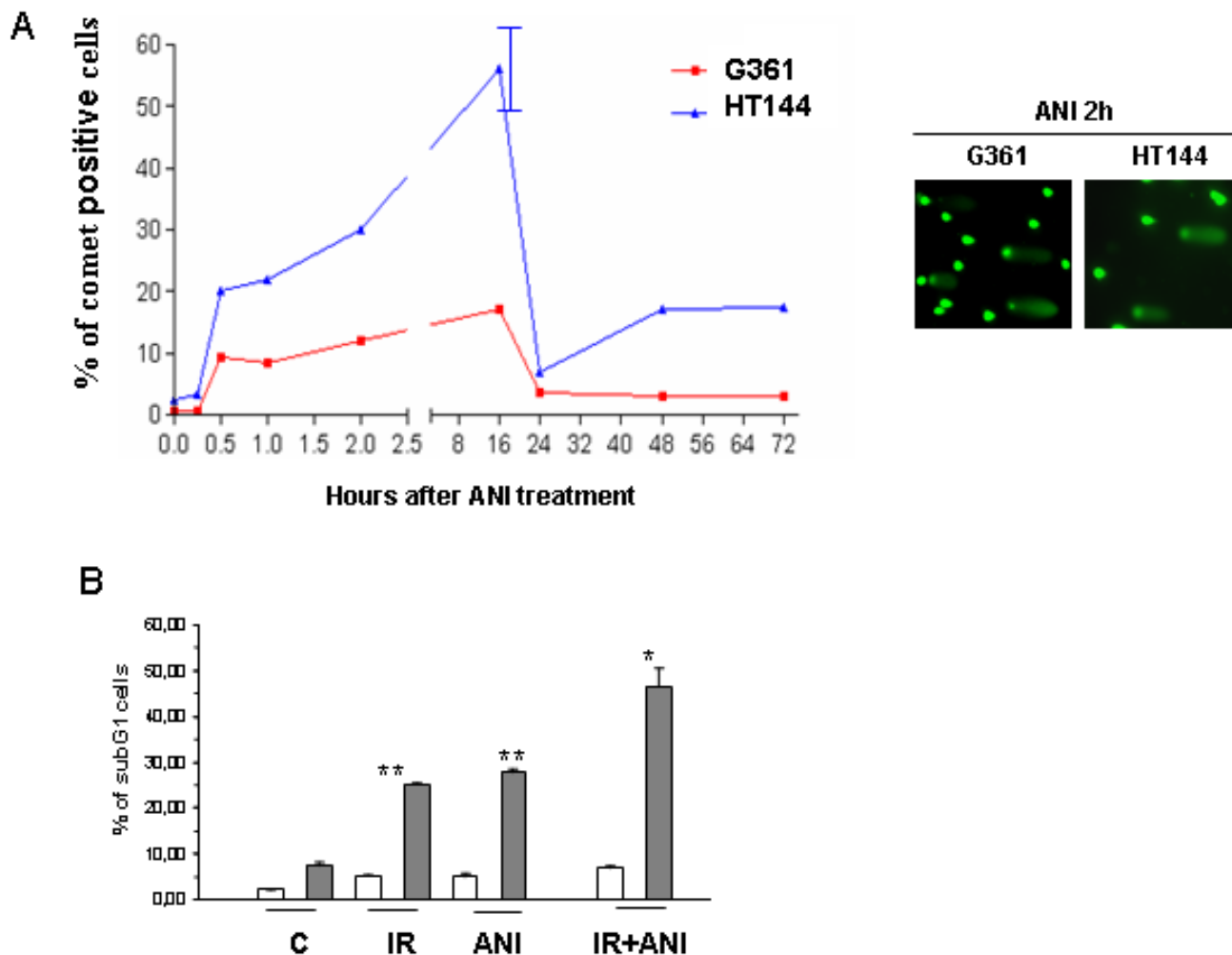
Cells have evolved various sophisticated pathways to sense and overcome DNA damage as a mechanism to preserve the integrity of the genome. Environmental attacks like radiations or toxins, or spontaneous DNA lesions, trigger checkpoint activation and consequent cell cycle arrest leading to DNA repair or apoptosis. Two key proteins that coordinate recognition of DNA damage and signal transduction to p53 are ATM and PARP-1. ATM and PARP-1 participate in distinct forms of DNA repair that partially compensate for each other. PARP-1 and ATM participate in base excision repair (BER) and homologous recombination (HR), respectively. It is normally assumed that ATM signals for double strand breaks while PARP-1 participates in signalling from single DNA strand lesions. Here we report that these two proteins form a molecular complex that co-localizes in DNA damage foci.

Considerable evidence from *in vitro*, cell culture and *ex vivo* studies shows that poly(ADP-ribosylation) plays a critical role in the survival and maintenance of genomic stability of proliferating cells exposed to low or moderate levels of DNA-damaging agents [18]. The data presented in this study strongly support a role for PARP-1 and poly(ADP-ribose) in ATM activation: in the absence of PARP-1 there is a deficient ATM-kinase activation in response to ionizing radiation as measured by intrinsic kinase activity and H2AX phosphorylation. These results are in agreement with previous data showing that PARP-1 deficient mice are extremely sensitive to low doses of  $\gamma$ -radiation (as is the case for ATM-null mice), and this phenotype could be ascribed to a deficient ATM-kinase activation in tissues such as the intestine epithelium [9]. Also, results from our group have shown that p53 accumulation and p53-dependent gene activation are compromised in *parp-1* knockout cells after  $\gamma$ -irradiation [15]. The insight of the consequences of the poly(ADP-ribosylation) of ATM are not clear yet since the inhibition of PARP induced indirectly DNA DSB, initiating new responses to DNA damage that interfere with elucidation of the activation of ATM.

PARP inhibitors have been used as radio and chemo-sensitizers in a number of experimental settings and a mechanism for DSB induction through the collision of unrepaired single DNA strand lesions with replication forks has been suggested [19,20]. Early reports claimed that the PARP inhibitor 3-aminobenzamide was a radiosensitizer only in rodent cells [21] however more recently ANI (1000-fold more potent at inhibiting PARP activity compared with 3-aminobenzamide (3-ABA)) has been found to be radiation sensitizer to both rodent and human tumor cells [9,15,22]. The novel PARP inhibitor AG14361 has shown to increase the specificity and *in vivo* activity to enhance radiation therapy of human cancer through vasoactive effects and not directly in the cells in culture [23]. Therefore the question still remains open as to how human tumors could benefit from PARP inhibition during radiotherapy.

The second main conclusion in this study is that inhibition of PARP-1 activity leads to DSBs induction and activation of ATM and, at the same time, prevents IR-induced ATM-kinase activity. From the results presented here, there is a clear duality in the effect of PARP inhibition on ATM: while the lack of response to IR in ANI treated cells indicates that poly(ADP-ribosylation) of ATM is probably needed for optimal ATM activation, long term exposure to PARP inhibitor results in the generation of DSBs and secondarily in the activation of ATM kinase. DSBs generated in this way are due to stalled replication fork [24] and they are resolved by homologous recombination (HR), providing a therapeutic opportunity to specifically





**Figure 4**  
 PARP inhibitors activate DSB repair by homologous recombination. A: neutral comet assay for detection of double strand breaks. For scoring the comet pattern, 800 nuclei from each slide were counted. HT144 ATM-deficient cells display more DSBs than G361 ATM-proficient cells after ANI treatment and only ATM wild type cells were able to completely resolve DSBs. Experiment is one representative of three similars. B: Analysis of cell death. Sub-G1 analysis was performed by flow cytometry using the propidium iodide (PI) DNA-staining method. Increased cell death with ANI is observed after long times of exposure (72 hours) in ATM-deficient cells (HT144, grey bars and ATM-proficient cells, G361, white bars) treated either with ANI alone or in combination with  $\gamma$ -irradiation respect ATM-proficient cells. Results represent the average  $\pm$  SEM of three independent observations. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  respect to untreated HT144.

kill HR deficient tumor cells, as has been previously shown by different laboratories [25,26].

In summary, our study demonstrates a strong association between ATM and PARP-1 during the response to ionizing radiation, being PARP-1 and its activity needed for optimal activation of ATM kinase. On the other hand, inhibition of PARP leads to the activation of ATM kinase as result of the generation of DSBs, making ATM deficient cells particularly sensitive to PARP inhibitors.

**Conclusion**

In this study we demonstrate the physical interaction between PARP-1 and ATM in response to ionizing radiation, the modification of ATM by poly(ADP-ribose) and the functional consequences of this interaction in PARP-1 deficient cells, where the activation of ATM kinase is compromised in response to IR. Additionally, PARP inhibition induces DNA double strand breaks who are resolved in an ATM-dependent manner. As result of that, ATM kinase is activated by PARP inhibition and ATM deficient cells are

much more sensitive to PARP inhibition than ATM proficient cells.

## Methods

### Cell culture and treatments

We have used immortalised (3T3) murine embryonic fibroblasts expressing or lacking PARP-1 from *parp-1* +/- and -/- mice. G361 and HT144 are respectively wild type and A-T cell lines from a melanoma patient [14] (a kind gift from Dr. Y. Shiloh, Sackler School of Medicine, Tel Aviv).

Cells were in exponential growth at the time of IR treatment and the PARP inhibitor ANI was dissolved in culture medium at a concentration of 10  $\mu$ M. It was added 60 min prior to IR. Irradiations, with or without ANI co-treatment, were performed using a  $^{60}\text{Co}$  source at a dose rate of 1.67 Gy/min. The used in all experiments was 10 Gy, unless otherwise stated.

### Indirect immunofluorescence

Immunostaining for ATM,  $\gamma$ -H2AX, PARP-1 and PAR (poly(ADP-ribose)) were performed on cells plated onto coverslips and grown for 24 h before treatments. The medium was removed, the coverslips rinsed twice in PBS (37°C) and fixed in ice-cold methanol-acetone (1:1) for 10 minutes in the experiments with ATM,  $\gamma$ -H2AX, and in formaldehyde 4% for 10 minutes in the experiments with PARP-1 or PAR. The coverslips were rinsed twice in PBS-T (PBS containing 0.1% Tween-20) prior to incubation with primary antibody for 16 h at 4°C. The primary antibodies used in these experiments were: rabbit polyclonal IgG anti-phospho-H2AX (Ser139) (Upstate, Lake Placid, NY), mouse monoclonal IgG anti-PARP (Ab-2, Oncogene). anti-ATM mouse monoclonal antibody SYR 10G3/1 was a kind gift from Y. Shiloh (Tel Aviv University); anti-PAR rabbit polyclonal antibody was purchased from Biomol, Plymouth Meeting, PA. The coverslips were rinsed 3 times in PBS-T followed by a 45 min incubation at room temperature in the dark and then rinsed 4  $\times$  5 min in PBS-T. The secondary antibodies used in this study were FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, St. Louis, MO) and Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO) at a concentration of 1:400. Antibodies were diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin and 5% goat serum. Nuclear counterstaining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) was performed after removal of excess secondary antibody. Slides were prepared using the Vectashield mounting medium (Vector Lab., Inc., Burlingame, CA 94010), coverslipped and stored in the dark at 4°C. Immunofluorescence images were obtained linear range of detection to avoid signal saturation using a Leica confocal microscopy.

### Immunoprecipitation and western blotting assay

Cell extracts, SDS-PAGE electrophoresis and western blotting were performed as previously described [15]. For immunoprecipitation, cell lysates were precleared by constant mixing for 2 hours with protein A-Sepharose (Pharmacia). The beads were removed by centrifugation, and the supernatant was mixed constantly overnight with a monoclonal antibody against ATM (SYR 10G3/1) or PARP-1 (Anti-PARP-1 Ab-2, Oncogene). Immune complex were adsorbed onto protein A-Sepharose, boiled and electrophoresed on polyacrylamide gels. The membranes were probed with antibodies directed against ATM (SYR 10G3/1, Tel Aviv University), PARP-1 (Anti-PARP-1 Ab-2, Oncogene) and Poli (ADP-Ribose) (Biomol).

### In Vitro ATM-kinase assay

ATM kinase assays were conducted using the protocol described by Sarkaria *et al.* [16]. ATM was immunoprecipitated from G361 cell extracts and from *parp-1* +/- and *parp-1* -/- murine spleen extracts. Briefly cell extracts were prepared by resuspending cells in lysis buffer (20 mM HEPES pH = 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, with protease inhibitors and 0.2% Tween during 20 minutes at 4°C. The lysates were clarified by centrifugation and immunoprecipitations were carried out with SYR 10G3/1 anti-ATM mouse monoclonal antibody. Then immune complex were adsorbed onto protein A-Sepharose and washed twice with kinase buffer (10 mM HEPES pH = 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) and once with a high salt buffer (0.1 M Tris-HCl pH = 7.4, 0.6 M NaCl). Kinase reactions were initiated with the addition of an equal volume of kinase buffer containing PHAS-I (20 ng/ml), 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT and 10 mM [<sup>32</sup>P]ATP. Kinase reactions were performed at 30°C during 20 minutes and terminated by the addition of 6 $\times$ SDS loading buffer (1:1), and reaction products were resolved by SDS-PAGE. Incorporation of <sup>32</sup>P into the PHAS-I substrate was evaluated by phosphorimaging. All kinase reactions were performed under linear reaction conditions. Equal loading in each lane was guaranteed by coomassie blue staining.

### Abbreviations

ATM, ataxia telangiectasia

BER, base excision repair

DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DSB, double strand break

DTT, 1,4-dithiothreitol

EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid

HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HR, homologous recombination

MNU, N-methyl-N-nitrosourea

PAR, poly(ADP-ribose)

PARP, poly(ADP-ribose) polymerase

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

### Authors' contributions

RA-Q carried out poly(ADP-ribosylation) studies, immunofluorescence, ATM kinase, comet assay and apoptosis studies; JAMG contributed to apoptosis studies; DMO helped with ATM kinase assay; AP, MTV, RMR and RQP contributed to immunoprecipitation and comet assays studies. JMM, GdM, MRdA conceived and participated in design the study. FJO conceived of the study, and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We would like to acknowledge to the staff of the Radiotherapy Unit of the San Cecilio University Hospital, and particularly to Damian Guirado, for their help in the treatment of the cells and to Dr. Abelardo Lopez-Rivas (CABIMER, CSIC, Seville) for helpful discussion. This work has been supported by grants SAF 2003-01217, RNIHG c03/02, PI050972, SAF2006-01089 and FIS G03/152 to FJO, grants CICYT SAF:2001-3533 and SAF2004-00889 to JMRdA; grant FIS c03/02 to RQP.

### References

- Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS, Baltimore D: **Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma.** *Genes Dev* 1996, **10(19)**:2411-2422.
- Herzog KH, Chong MJ, Kapsetaki M, Morgan JL, McKinnon PJ: **Requirement for Atm in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system.** *Science* 1998, **280(5366)**:1089-1091.
- Elson A, Wang Y, Daugherty CJ, Morton CC, Zhou F, Campos-Torres J, Leder P: **Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93(23)**:13084-13089.
- Shiloh Y, Kastan MB: **ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths.** *Adv Cancer Res* 2001, **83**:209-254.
- Abraham RT: **Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases.** *Genes Dev* 2001, **15(17)**:2177-2196.
- Durocher D, Jackson SP: **DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?** *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13(2)**:225-231.
- Bakkenist CJ, Kastan MB: **DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation.** *Nature* 2003, **421(6922)**:499-506.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG: **Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions.** *Biochem J* 1999, **342 ( Pt 2)**:249-268.
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G: **Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94(14)**:7303-7307.
- de Murcia G, Menissier de Murcia J: **Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor.** *Trends Biochem Sci* 1994, **19(4)**:172-176.
- Marecki JC, McCord JM: **The inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances growth rates of ataxia telangiectasia cells.** *Arch Biochem Biophys* 2002, **402(2)**:227-234.
- Menissier-de Murcia J, Mark M, Wendling O, Wynshaw-Boris A, de Murcia G: **Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development.** *Mol Cell Biol* 2001, **21(5)**:1828-1832.
- Watanabe F, Fukazawa H, Masutani M, Suzuki H, Teraoka H, Mizutani S, Uehara Y: **Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits ATM kinase activity in DNA damage response.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **319(2)**:596-602.
- Valenzuela MT, Guerrero R, Nunez MI, Ruiz De Almodovar JM, Sarker M, de Murcia G, Oliver FJ: **PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response.** *Oncogene* 2002, **21(7)**:1108-1116.
- Bryant HE, Helleday T: **Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activates ATM which is required for subsequent homologous recombination repair.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34(6)**:1685-1691.
- Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG: **PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage.** *Exp Hematol* 2003, **31(6)**:446-454.
- Noel G, Godon C, Fernet M, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Favaudon V: **Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5(3)**:564-574.
- Horton J. K, SDF Kedar P. S. and Wilson S. H.: **ATR signaling mediates an S-phase checkpoint after inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity.** *DNA Repair* 2007, **In press**.
- Little JB, Ueno AM, Dahlberg WK: **Differential response of human and rodent cell lines to chemical inhibition of the repair of potentially lethal damage.** *Radiat Environ Biophys* 1989, **28(3)**:193-202.
- Schlicker A, Peschke P, Burkle A, Hahn EW, Kim JH: **4-Amino-1,8-naphthalimide: a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase and radiation sensitizer.** *Int J Radiat Biol* 1999, **75(1)**:91-100.
- Calabrese CR, Batey MA, Thomas HD, Durkacz BW, Wang LZ, Kyle S, Skalitzky D, Li J, Zhang C, Boritzki T, Maegley K, Calvert AH, Hostomsky Z, Newell DR, Curtin NJ: **Identification of potent non-toxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotentiation and pharmacological studies.** *Clin Cancer Res* 2003, **9(7)**:2711-2718.
- Helleday T, Bryant HE, Schultz N: **Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy.** *Cell Cycle* 2005, **4(9)**:1176-1178.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T: **Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.** *Nature* 2005, **434(7035)**:913-917.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A: **Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.** *Nature* 2005, **434(7035)**:917-921.
- Ramsay J, Birrell G, Baumann K, Boderio A, Parsons P, Lavin M: **Radiosensitive melanoma cell line with mutation of the gene for ataxia telangiectasia.** *Br J Cancer* 1998, **77(1)**:11-14.
- Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT: **Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine.** *Cancer Res* 1999, **59(17)**:4375-4382.



# Modulation of Transcription by PARP-1: Consequences in Carcinogenesis and Inflammation

R. Aguilar-Quesada<sup>1</sup>, J.A. Muñoz-Gómez<sup>2</sup>, D. Martín-Oliva<sup>3</sup>, A. Peralta-Leal<sup>1</sup>, R. Quiles-Pérez<sup>4</sup>, J.M. Rodríguez-Vargas<sup>1</sup>, M. Ruiz de Almodóvar<sup>2</sup>, C. Conde<sup>5</sup>, A. Ruiz-Extremera<sup>4</sup> and F.J. Oliver<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada

<sup>2</sup>IBIMER, Universidad de Granada

<sup>3</sup>Dpto. de Biología Celular, Universidad de Granada

<sup>4</sup>Hospital Universitario San Cecilio, Granada

<sup>5</sup>Hospital Xeral de Galicia, Santiago de Compostela

**Abstract:** Post-translational modification of proteins by poly(ADP-ribosylation) is involved in the regulation of a number of biological functions. While an 18 member superfamily of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) has been described PARP-1 accounts for more than 90% of the poly(ADP-ribosylating) capacity of the cells. PARP-1 act as a DNA nick sensor and is activated by DNA breaks to cleave NAD(+) into nicotinamide and ADP-ribose to synthesize long branching poly(ADP-ribose) polymers (PAR) covalently attached to nuclear acceptor proteins. Whereas activation of PARP-1 by mild genotoxic stimuli facilitate DNA repair and cell survival, severe DNA damage triggers different pathways of cell death including PARP-mediated cell death through the translocation of apoptosis inducing factor (AIF) from the mitochondria to the nucleus. PAR and PARP-1 have also been described as having a function in transcriptional regulation through their ability to modify chromatin-associated proteins and as a cofactor of different transcription factors, most notably NF- $\kappa$ B and AP-1. Pharmacological inhibition or genetic ablation of PARP-1 not only provided remarkable protection from tissue injury in various oxidative stress-related disease models but it result in a clear benefit in the treatment of cancer by different mechanisms including selective killing of homologous recombination-deficient tumor cells, down regulation of tumor-related gene expression and decrease in the apoptotic threshold in the co-treatment with chemo and radiotherapy. We will summarize in this review the current findings and concepts for the role of PARP-1 and poly(ADP-ribosylation) in the regulation of transcription, oxidative stress and carcinogenesis.

## INTRODUCTION

PARP-1 is the founding member of the PARP family that contains as many as 18 distinct proteins in humans [1]. PARP-1 is an abundant nuclear protein found in most eukaryotes apart from yeast. It binds to DNA strand breaks and concomitantly synthesizes oligo- or poly(ADP-ribose) chains using NAD<sup>+</sup> as substrate and covalently coupled to various acceptor proteins or to itself resulting in the attachment of linear or branched polymer of poly(ADP-ribose). PARP-1's full activation is strictly dependent on the presence of strand breaks in DNA and is modulated by the level of automodification [1, 2] (Fig. (1)). PARP family members share a conserved catalytic domain that contains the "PARP signature" motif, a highly conserved sequence (100% conserved in PARP-1 among vertebrates) that forms the active site [1]. Some PARP family members identified solely on homology, however, have not yet been shown to possess intrinsic PARP enzymatic activity [3]. In addition to a catalytic domain, PARP family members typically contain one or more additional motifs or domains, including zinc fingers, "BRCA1 C-terminus-like" (BRCT) motifs, ankyrin repeats, macro domains, and WWE domains (a protein-protein interaction motif), conferring specific properties to the different PARP members [4].

PARP-1 has a highly conserved structural and functional organization including an N-terminal double zinc finger DNA-binding domain (DBD) [1], a nuclear localization signal [2], a central automodification domain [3], and a C-terminal catalytic domain [4] (Fig. (2)). PARP-1's basal enzymatic activity is very low, but is stimulated dramatically in the presence of a variety of allosteric activators, including damaged DNA, some

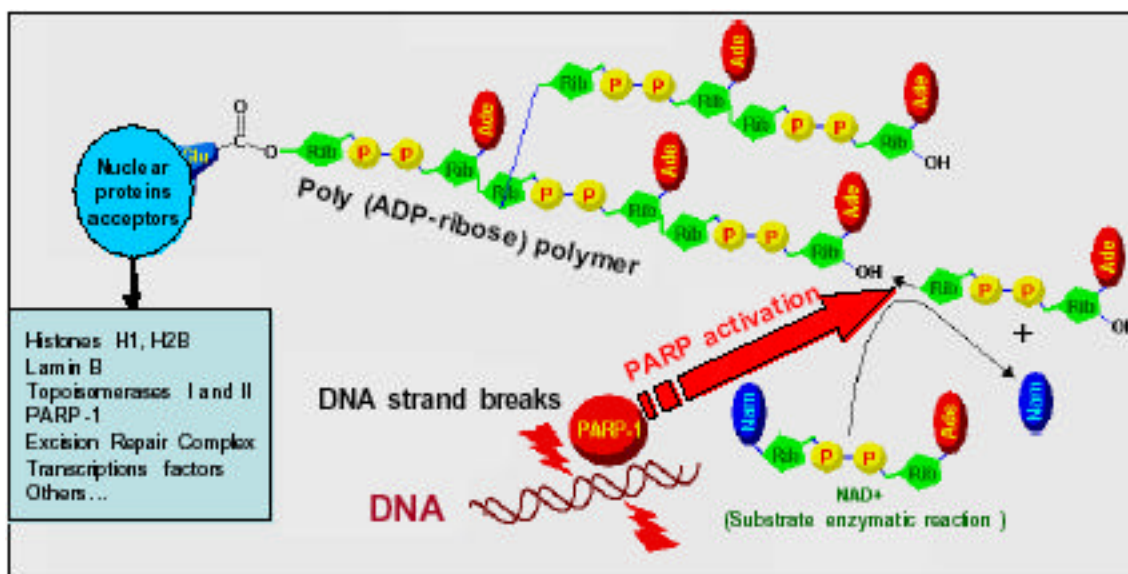
undamaged DNA structures, nucleosomes, and a variety of protein-binding partners [3, 5]. The targets of PARP-1's enzymatic activity include PARP-1 itself, which is the primary target *in vivo*, core histones, the linker histone H1, and a variety of transcription-related factors that interact with PARP-1 [3, 5-7] (Fig. (1)).

The DNA binding domain contains a repeated sequence (residues 2-97 and 106-207) in which 35 amino acids are duplicated. Interestingly these residues are strictly conserved during evolution and are crucial for DNA interaction. These crucial residues for DNA-binding consist in two zinc finger residues (FI and FII) [8] (Fig. (2)). The automodification domain of PARP-1 is rich in glutamic acid residues, consistent with the fact that poly(ADP-ribose)lation occurs on such residues. This domain also comprises a BRCT motif that is present in many DNA damage repair and cell-cycle checkpoint proteins [5, 8-9]. Globally, the structure and activities of PARP-1 suggest important roles for this in a variety of cell functions. The activities and functions of the other PARP family members have not been studied to the same extent as PARP-1, although a clearer picture for some of the PARP family members has been emerging, as noted below and reviewed in more detail elsewhere [1, 4].

## PARP in Genome Integrity

Although the most recent findings challenge the concept that the obligatory trigger of PARP-1 activation are the nicks and breaks in the DNA strand [4], this stimulus remains the most studied and well known. DNA damage can be induced by a variety of environmental stimuli including free radical oxidation, alkylation's, and ionizing radiation. The binding of PARP-1 to damaged DNA, including single-strand breaks (SSBs) and double-strand breaks (DSBs), through its double zinc finger DNA-binding domain potently activates PARP-1 enzymatic activity (as much as 500-fold) [10, 11]. As such,

\*Address correspondence to this author at the Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Avda Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain; Tel: 34958181655; Fax: 34958181632; E-mail: joliver@ipb.csic.es

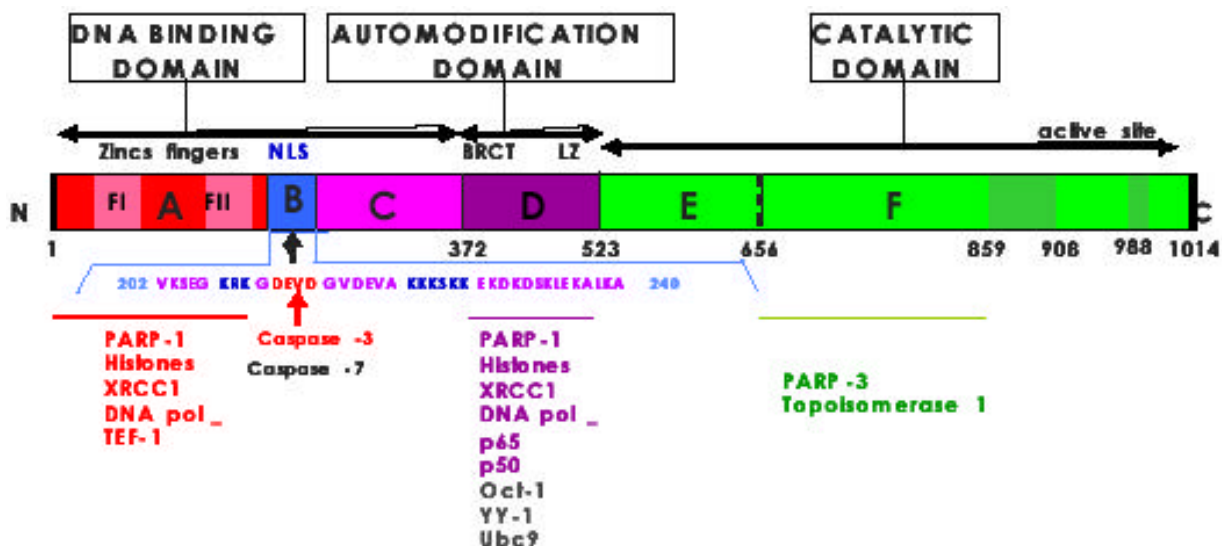


**Fig. (1).** DNA damage induces PARP-1 activation. A number of genotoxic agents that produces DNA strand breaks activates PARP-1 leading to poly(ADP-ribose) polymer formation from NAD<sup>+</sup> and consequent covalent modification by poly(ADP-ribosylation) of different nuclear proteins.

PARP-1 can function as a DNA damage sensor (Fig. (1)). With low levels of DNA damage, PARP-1 acts as a survival factor involved in

DNA damage detection and repair. In contrast, with high levels of DNA damage, PARP-1 promotes cell death [12]. PARP-1 has been implicated in multiple DNA repair pathways, including the SSB, DSB, and base excision repair (BER) pathways [13]. PARP-1 interacts physically and functionally with various proteins involved in these DNA repair pathways, and may recruit the repair proteins to sites of DNA damage [14]. PAR itself, as a covalent attachment of automodified PARP-1, may also act to recruit repair proteins to sites of DNA damage. PARP-2, the only other PARP enzyme whose catalytic activity is known to be stimulated by damaged DNA, has also been implicated in BER through interactions with XRCC-1 and PARP-1 [15, 16].

The DNA damage response is currently viewed as a signal-transduction pathway involving sensors that activates signal transducers upon detection of damaged DNA. These transducers in turn modulate the activity of effectors that redirect cellular functions while the damage is being repaired. Cellular responses to genomic insults include activation of DNA repair pathways, cell cycle arrest, and initiation of cell death processes [17]. A function of PARP-1 as a nick sensor has been proposed [18]. Its rapid activation in response to DNA strand breaks may result in the poly(ADP-ribosylation) of key enzymes such as transducers of the DNA damage. Alternatively, PARP-1 auto-poly(ADP-ribosylation) could result in the recruitment of transducers to the damaged site (Fig. (1)). How PARP and poly(ADP-ribosylation) participate in the initial cell's response to DNA damage and their interaction with key players of this pathway (such as p53 and ATM) has been extensively reviewed previously [13].



**Fig. (2).** Structural domains of human PARP-1. DNA binding domain (DBD) contains two zinc finger structures (FI and FII), the nuclear localization signal (NLS) and caspases -3 and -7 cleavage site; Automodification domain contains BRCT (*BRCA1* like C-terminus) motif and Leucine zipper motif (LZ); and C-terminal Catalytic domain. Also, the interactions of PARP domains with others proteins are showed.

In the present review we will focus on different aspects of PARP's role in the regulation of transcription and the consequences in carcinogenesis and inflammation.

### PARP-1 AND TRANSCRIPTION

A very important aspect of PARP-1 is its involvement in the modulation of chromatin structure and transcription [17]. PARP-1's enzymatic activity is stimulated dramatically by the binding of PARP-1 to damaged DNA and hence, most studies of PARP-1 have focused on its role in DNA repair and cell death pathways [4]. Considerably less is known about the chromatin-dependent gene regulatory activities of PARP-1 under physiological conditions where the integrity of the genome is maintained. As mentioned above, the PARP-1's literature is replete with the view that

PARP-1 enzymatic activity is strictly dependent on damaged DNA as an allosteric activator [5]. However, studies identifying other allosteric activators, including certain undamaged DNA structures [18] and PARP-1 binding proteins [19], have challenged this view. Nucleosomes, for example, are potent activators of PARP-1 auto(ADP-ribosylation), more than damaged DNA [20].

Two modes of PARP-1 regulatory activity of transcription have been proposed: (1) a histone-modifying enzymatic activity that can regulate chromatin structure and (2) an enhancer/promoter binding cofactor activity that can act in conjunction with other transcription-related factors [17] (Fig. (3)). In summary, PARP-1 can function both as a structural component of chromatin and as a modulator of chromatin structure through an intrinsic enzymatic activity.

#### PARP-1-Dependent Histone-Modifying Activity and Transcription

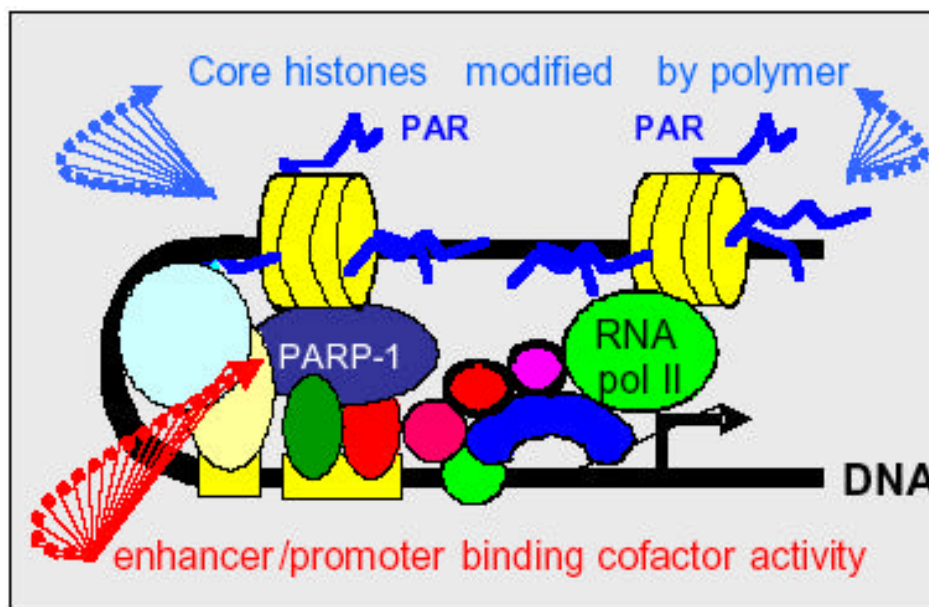
PARP-1 exerts its effects in modulating chromatin by directly (ADP-ribosyl)ating core histones and chromatin associated proteins, thereby promoting the dissociation of nucleosomes and the decondensation of chromatin [5, 17, 21, 23]. Although it cannot be excluded that trans-modification is

not necessary for PARP-1-dependent regulation of chromatin structure.

PARP-1 is an abundant nuclear protein supporting the idea that either itself or PARP-1-related proteins (with functional redundancy) can function as a structural component of chromatin *in vivo* [22]. In this model, PARP-1, when incorporated into compact transcriptionally repressed chromatin structures, is poised for NAD<sup>+</sup>-dependent activation, automodification, and subsequent release from chromatin, facilitating chromatin decondensation and transcription by Pol II [22]. DNA binding transcriptional activators could provide the trigger for PARP-1 by recruiting NAD<sup>+</sup>-synthesizing enzymes. Automodification of PARP-1 is acutely sensitive to small changes in ATP concentration. Thus, the numerous transcription-related factors that PARP-1 is an abundant nuclear protein supporting the idea that either itself or PARP-1-related proteins (with functional redundancy) can function as a structural component of chromatin *in vivo*. In this model, PARP-1, when incorporated into compact transcriptionally repressed chromatin structures, is poised for NAD<sup>+</sup>-dependent activation, automodification, and subsequent release from chromatin, facilitating chromatin decondensation and transcription by Pol II. DNA binding transcriptional activators could provide the trigger for PARP-1 by recruiting NAD<sup>+</sup>-synthesizing enzymes. Automodification of PARP-1 is acutely sensitive to small changes in ATP concentration. Thus, the numerous transcription-related factors that consume ATP have

the potential to reduce local ATP concentrations and increase PARP-1 enzymatic activity. On the other hand, the incorporation of PARP-1 protein into chromatin promotes the formation of higher-order chromatin structures that localize to discrete chromatin domains *in vivo* and this incorporation has a repressive effect on Pol II transcription *in vitro* [20].

A specific example of histone-modifying PARP-1 activity is puff formation in *Drosophila* polytene chromosomes, which presents PARP-1-dependent accumulation of PAR at decondensed, transcriptionally active loci [22]. PARP protein is widely distributed in *Drosophila* polytene chromosomes but is normally inactive. However, upon exposure to a heat shock stimulus, PARP accumulates rapidly at heat shock gene loci,



**Fig. (3).** Models of regulation of transcription activity by PARP-1. Two modes of PARP-1-dependent transcription regulation have been proposed. First, a histone-modifying by PARP-1 that can regulate chromatin structure; second, a transcriptional cofactor PARP-1 activity can enhance the transcription with other transcription-related factors (adapted of Krauss WL and Lis JT, 2003).

where it develops intense poly(ADP-ribose)ylation activity. Similarly, PARP accumulates at sites of ecdysone-induced puffs in polytene chromosomes of fruit fly larvae shortly before pupation. Inactive PARP is recruited, presumably by certain transcription factors, to target genes where it becomes activated. PARP then adds long ADP-ribose tails to the histone proteins of nucleosomes around which the DNA is wrapped. Nucleosomes containing poly-ADP-ribosylated histones are unable to remain tightly packed, resulting in "loosening" or decondensation of the chromatin. *In vitro* experiments suggest that transcription is initially facilitated by PARP, but as soon as transcription factors dissociate from the DNA, they too become inactivated through poly-ADP-ribosylation, thus preventing repeated cycles of transcription [23]. In this way, PARP ensures a strong but transient transcriptional response to a heat shock or ecdysone stimulus. Ultimately, PARP poly-ADP-ribosylates itself and dissociates from the DNA. The mechanism of PARP action seems adapted to facilitate sudden bursts of transcriptional activity in response to transient environmental signals [24].

Further support for the importance of PARP-1-mediated poly(ADP-ribose)ylation of chromatin modulators in the regulation of DNA-dependent processes [25] is the functional link between PARP-1 and FACT. FACT (facilitates chromatin transcription) is a heterodimer composed of hSpt16 and SSRP1 [27] that allows RNA polymerase II to proceed along the chromatin template. Biological functions of FACT are regulated by poly(ADP-ribose)ylation [26] and in this way, both, PARP-1 and FACT, are involved in the global regulation of chromatin architecture. hSpt16 but not SSRP1 is poly(ADP-ribose)ylated *in vivo* especially following genotoxic stress, and additionally, there is a direct interaction between hSpt16 and PARP-1 [26]. Nucleosome-binding activity of hSpt16 (and FACT) is decreased after poly(ADP-ribose)ylation. Whether poly(ADP-ribose)ylated FACT dissociate from nucleosome through the disruption of its interaction with the histones remains to be determined. These results suggest that pol II dependent transcription may be regulated through the modulation of chromatin-binding property of FACT by PARP-1 [28].

A recent report of Ju *et al.* [29] show that estrogen-dependent transcription of pS2 requires a promoter intermediate containing a double-strand break (DSB) that is generated by a protein complex containing topoisomerase II (TopoII) and PARP-1. TopoII and PARP-1 collaborate in an interesting way that alters the molecular composition and structure of the pS2 promoter during an estradiol (E2)-dependent transcriptional response. E2 not only rapidly induces an increase in binding of estrogen receptor (ER) to the promoter but also causes a concomitant rapid exchange of the co-repressors for what appears to be an activation complex containing PARP-1 and TopoII. Both PARP-1 and TopoII enzymatic activities are critical for the activation of pS2 transcription, although the definitive target of this PARP-1 enzymatic activity has yet to be determined [30]. Prior to treatment with E2, PARP-1 is associated with three adjacent nucleosomes in the promoter region (NucE and a nucleosome on each side, NucU and NucT), possibly acting as part of a repression complex [29] or as a direct nucleosome binding factor [20]. Upon estrogen treatment, PARP-1 departs from NucU and NucT, perhaps as a consequence of auto poly(ADP-ribose)ylation, resulting in a loss of nucleosome binding activity [20]. In addition, a PARP-1/TopoII activation complex containing the nuclear receptor coactivator ASC2 becomes concentrated on NucE. The factor dynamics on the three nucleosomes are accompanied by changes in chromatin structure. H1 is lost from NucE and is replaced with HMGB1/2, a non histone structural protein. H1 could be a target for poly(ADP-ribose)ylation by PARP-1, causing its release. Alternatively, PARP-1's ability to compete

with H1 for binding to nucleosomes could function in the dissociation of H1 from NucE [20]. In this system, a transient DSB occurs in promoter DNA adjacent to a nucleosome containing the DNA binding sequence for Er (NucE) and the formation of this DSB requires TopoII enzymatic activity and participates in the subsequent exchange of factors at the promoter. A possible role for the TopoII-dependent DSB in stimulating PARP-1 enzymatic activity has yet to be addressed. In addition to pS2, Ju *et al.* [29] observed recruitment of TopoII and PARP-1 and other components of the complex to the PSA, RAR, Dio1, and MMP12 promoters upon gene activation, as well as promoter cleavage.

### **PARP-1 as an Enhancer/Promoter Binding Cofactor**

With respect to the second mode of PARP-1 regulatory activity, the role of PARP-1 in transcription is well established with several independent studies revealing its potent effect on activators like AP-2 (activator protein 2), p53, NF- $\kappa$ B, B-Myb, TEF-1/Max, SP-1, YY-1 and STATs [31-40]. PARP-1 modulates the activity of key transcription factors involved in tumor promotion such as AP-1 (whose defective activation by either PARP inhibition or genetic deletion of PARP-1 results in an effective blockage of gene expression, [41]) and HIF-1 [70]. In addition, PARP-1 was identified among the constituents of positive cofactor-1 complex [42], essential for the activity of transcription factors such as NF- $\kappa$ B, Sp1 and Oct-1. Nevertheless, the exact mechanism by which PARP-1 affects transcription lacks clarity and the ambiguity is evident in some cases.

PARP-1 has been shown to play different roles on transcription factors, depending on the presence of specific binding partners, the proliferative status of the cell, the concentration of NAD<sup>+</sup> and the presence of DNA strand breaks. In the presence of NAD<sup>+</sup>, PARP-1 dependent silencing of transcription involves poly(ADP-ribose)ylation of specific transcription factors like p53 and fos [43, 44], which prevents both their binding to the respective DNA consensus sequences and the formation of active transcription complexes [23, 45-48], reporting a negative role for PARP-1 in transcription regulation. Direct interaction of PARP-1 protein with its own gene promoter resulted in suppression of transcription [48]. However, in response to DNA damage, PARP-1 catalytic activity was stimulated and automodification of PARP-1 subsequently prevented its interaction with the promoter. This relieved the PARP-mediated block on the promoter and allowed for transcription of PARP-1 and other genes suppressed by PARP-1. In the absence of NAD, PARP-1 promotes activator-dependent transcription by interacting with RNA polymerase II-associated factors [46, 49], transcription enhancer factor 1 (TEF1) and an increasing number of transcription factors, including AP-2, B-Myb, YY-1, Oct 1, NF- $\kappa$ B, and p53 [32, 33, 36, 46, 50-53]. Other example is HSF-1, which requires nuclear presence of PARP-1, but not its catalytic activity, for the DNA binding. On the other hand, PARP-1, either alone or in a heterodimeric complex with Ku protein, has been shown to specifically bind internal sequences of matrix attachment regions (MARs) [54] that are required for extending chromatin domains and enhancer-distal positions accessible to transcription factors.

PARP-1 may have a dual regulatory role with opposing effects and it is possible that PARP-1 studies on some transcription factors had characterized and interpreted only one of the two effects. The case of AP-2-dependent transcription [55] is an example of dual regulation, where the C-terminal enzymatic domain of PARP-1 strongly interacts with AP-2 to poly(ADP-ribose)ylate it affecting negatively its DNA binding and thereby its transcriptional activation. However, the low-affinity interaction of the middle region has an enzymatic



activity-independent positive effect on AP-2 transcription and it is possible that PARP-1 connect AP-2 to the general transcriptional machinery. Griesenbeck *et al.* [56] revealed that automodification of PARP-1 plays a crucial role in choosing partners to interact with. It is possible that the state of automodification determines the time of interaction with AP-2 and histones. The structural overlap of the automodification region with the co-activator domain may represent an important built-in regulatory mechanism. This may also explain the existence of a weaker interaction of AP-2 with this region. In view of this, PARP-1 has an important biological function beyond its enzymatic activity and warrants a new look at this molecule as a multifaceted protein rather than as one with a single catalytic function with multiple effects.

On the contrary, PARP-1 does not exert a dual effect on E2F-1 transcriptional activation because E2F-1 is not a substrate for modification by PARP-1 [57]. PARP-1 binds E2F-1 through the automodification domain of PARP-1 and together, as a complex, augments binding to the E2F-1 promoter region and expression of E2F-1-responsive genes (including E2F-1 itself) [58] thus verifying that PARP-1 acts as a positive co-activator of E2F-1-mediated transcription. That PARP-1 neither binds internal sequences of the E2F-1 promoter nor modifies E2F-1 by poly(ADP-ribosyl)ation is consistent with the fact that PARP-1-E2F-1 binding does not require the DNA-binding domain or the catalytic active site of PARP-1. PARP-1 also enhances the transactivation of B-Myb independently of PARP-1 enzymatic activity [33]. Given that binding sites for E2F-1 are also present in b-myb promoters [59], it is possible that, in addition to direct binding of PARP-1 to B-Myb, PARP-1 can induce b-myb transcription by its coactivation of E2F-1. In this case, PARP-1 does not play a direct role in the transcription of E2F-1-responsive genes by binding to internal E2F-1 promoter sequences and acting as a transcription factor itself, unlike its sequence-specific interaction with other DNA elements such as MCAT1 elements, the Reg gene promoter, the IUR element in the CXCL1 gene, and HTLV-1 TxREs [46, 60-62]. Within the CXCL1 promoter, the IUR element binds PARP-1 [61]. In normal melanocytes, PARP-1 activity is silent, leading to binding of PARP-1 to the promoter of CXCL1 and preventing NF- $\kappa$ B from binding to the promoter. However, in cancer cells exhibiting bioenergetic malfunction, this balance is shifted, resulting in more auto-poly(ADP-ribosylation) of PARP-1, dissociating PARP-1 from the promoter and allowing for an increased binding of NF- $\kappa$ B to the promoter and activated transcription. Here, aberrant activation of PARP-1 in melanoma cells regulates the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B. Thus, it appears that the physical interaction of PARP-1 with the CXCL1 promoter asserts a negative effect in transcription, whereas the activity of PARP-1 is important in promotion of CXCL1 transcription. PARP-1 regulates CXCL1 gene expression both negatively and positively, once more having a dual role as a transcriptional modulator [63], where a fine balance exists between the inactive and active state of PARP-1. Moreover, the cell/tissue- and pathway-specific roles of PARP-1 in transcription have been clearly demonstrated [40].

PARP-1 has been suggested to act as a promoter-specific coactivator [65]. PARP-1 has been identified as an interaction partner not only of NF- $\kappa$ B but also of several sequence specific transcription factors and cofactors including Oct-1, and PC3/topoisomerase-I [65] and has been shown to increase the transcriptional activity of these transcription factors [65].

#### **PARP-1 in the NF- $\kappa$ B, HIF and TCF-4/ $\beta$ -Catenin Pathways: Implications in Carcinogenesis**

PARP-1 can act both as an inhibitor and activator of NF- $\kappa$ B-dependent transcription. In the context of NF- $\kappa$ B target gene

transcriptional regulation, Chang and Alvarez-Gonzalez [64] reported that direct PARP-1 interaction with NF- $\kappa$ B inhibits the binding of NF- $\kappa$ B to its element and this inhibition is relieved by the auto-poly(ADP-ribosylation) of PARP-1. Several reports demonstrated that coactivator activity of PARP-1 for NF- $\kappa$ B-dependent gene expression seems to be dependent on the stimuli and cell type [65]. PARP-1 directly interacted with both subunits of NF- $\kappa$ B (p65 and p50) *in vitro* and *in vivo* [66]. Remarkably, neither the DNA binding nor the enzymatic activity of PARP-1 was required for full activation of NF- $\kappa$ B in response to various stimuli *in vivo* [66]. Note that PARP-1 is an important regulator of skin carcinogenesis and this is due, at least in part, to its ability to modulate the response through NF- $\kappa$ B [41]. In addition, PARP-1 directly interacted with p300/CBP and synergistically coactivated NF- $\kappa$ B-dependent transcription [51]. NF- $\kappa$ B-dependent trans-activation of PARP-1-dependent promoters not only requires the enzymatic activity of the co-activator of NF- $\kappa$ B p300/CBP but also that PARP-1 itself is acetylated *in vivo* in response to inflammatory stimuli. However, the exact molecular mechanism by which acetylation of PARP-1 regulates the co-activator activity of PARP-1 in the context of chromatin remains to be investigated. Acetylation of PARP-1 is required for the interaction with p50 and the transcriptional activation of NF- $\kappa$ B in response to inflammatory stimuli. Acetylation of PARP-1 might be mainly required for the NF- $\kappa$ B-dependent promoter activity. However, it remains to be further investigated whether acetylation of PARP-1 could also strongly influence other sequence-specific transcription factors or cofactors under certain conditions. The synergistic coactivation of PARP-1, p300/CBP, and also the Mediator complex was dependent on acetylation of PARP-1. Based on the multistep interaction model of transcriptional activation proposed by Malik *et al.* [67], PC1/PARP-1 might facilitate together with other structural/architectural positive cofactors the co-operative interactions between sequence-specific activators and different co-activator complexes such as p300/CBP and Mediator, thereby providing an architectural function in stabilizing the pre-initiation complex [65].

PARP-1 interacts *in vivo* with the Mediator complex under physiological conditions and directly interacted *in vitro* with the Mediator subunits MED14 and CDK8 as well as the TFIIF subunit RAP74 but not with TFIIB, TATAbox-binding protein (TBP) and the tested TBP-associated factors. PARP-1 might only function during assembly of the pre-initiation complex [49]. Whether acetylation of PARP-1 might regulate the PARP-1 activity at this level in the context of chromatin remains to be investigated. However, it seems unlikely since the Mediator subunits DRIP150 and CDK8 did not bind to the acetylated domain in PARP-1. Acetylation of PARP-1 might be mechanistically required for the stabilization of preformed PARP-1 containing transcriptional coactivator-cofactor complexes and this modification is important for its role as transcriptional coactivator and the different physiological functions of PARP-1 might be in general regulated by post-translational modifications in a stimulus-dependent manner [68].

Expression and stabilization of Hypoxia Inducible Factor- $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) differs drastically between wild type and *parp-1*-deficient cells and also in the presence of the PARP inhibitor DPQ [41]. In some types of cancer models it has been reported that PARP-1 deletion contribute to a defective activation of transcription factors that play a key role in tumor development such as NF- $\kappa$ B, AP-1 and HIF [41, 70]. In the case of skin carcinogenesis the decreased susceptibility of *parp-1*<sup>-/-</sup> mice could also be attributed to the reduced inflammatory/oxidative stress component in *parp-1*<sup>-/-</sup> mice. In the absence of PARP-1, the oxidative cell damage produced during the inflammatory response in the initial steps of skin neoplasia is prevented

through the inactivation of key transcription factors involved in carcinogenesis [70] (Fig. (4)). Thus, inhibition or genetic elimination of PARP-1 interferes with the promotion of tumors of epithelial origin, in which inflammatory processes play a critical role [71]. Finally, another example of PARP-1 as transcriptional cofactor is TCF-4/  $\beta$ -catenin-evoked gene transactivation. PARP-1 physically interacts with the transcription factor TCF-4 and augments its transcriptional activity evoked by oncogenic  $\beta$ -catenin, participating in the transcriptional regulation of target genes. In addition, PARP-1 may be indirectly regulated by the TCF-4/  $\beta$ -catenin complex establishing a positive feedback loop that enhances PARP-1 expression [69].

These findings together with the fact that monotherapy with PARP inhibitors is effective in BRCA-1  $-/-$  and BRCA-2  $-/-$  cancer cells and tumors (due to the inability of these cells to repair by homologous recombination the stalled replication fork damages induced by PARP inhibitors) [72, 73] and the radio and chemopotential with the use of PARP inhibitors (Fig. (4)), place the PARP's field in the cutting edge in the pre-clinical advances in cancer treatment.

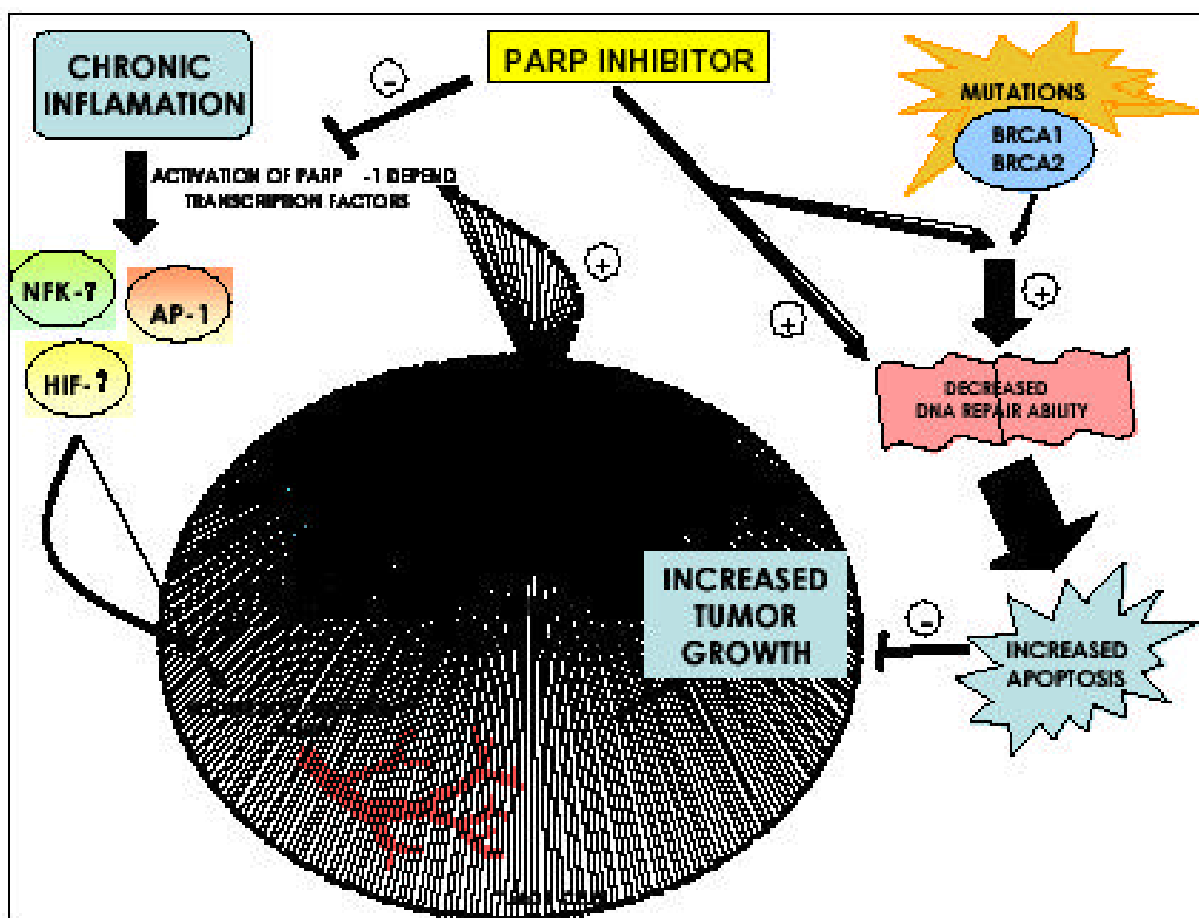
#### PARP-1 IN INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS AND CELL DEATH

It has been demonstrated in the last years that PARP-1 might play a significant role in the regulation of the inflammatory response. A considerable number of studies on either PARP-1 deficient mice or PARP inhibitors have revealed that the

inactivation of PARP-1 improves the outcome of a variety of patho-physiological conditions associated with an exacerbated tissue or systemic inflammation. Different mechanisms have been proposed to explain the role of PARP-1 in the inflammatory response.

#### PARP-1 in Inflammatory Diseases

Inflammation is the first response of the immune system to infection, irritation or other injury, which occurs as defensive response. Inflammation is characterised by the immediate infiltration at the site of injury or infection with immune system components and is manifest by increased blood supply and vascular permeability which allows chemotactic peptides, neutrophils, and mononuclear cells to leave the intravascular compartment. Peroxynitrite is a labile, toxic oxidant species produced from the reaction of superoxide and nitric oxide (NO) [74]. Peroxynitrite, as well as hydroxyl radical, are the key pathophysiologically relevant triggers of direct DNA single strand breakage [75]. Moreover, several studies have demonstrated that peroxynitrite produces mitochondrial injury as well as an increase in mitochondria-derived reactive oxygen species generation [76, 77]. Endogenous production of peroxynitrite and other oxidants by immunostimulated macrophages and neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cell [78-80]. Likewise, in brain slices (upon activation of NMDA receptors that trigger for enhanced NO, superoxide and peroxynitrite production) and smooth muscle cells, led to oxidant species-mediated DNA single strand



**Fig. (4).** Proposed model of action of PARP inhibitor in tumors. PARP inhibitors might interfere with tumor growth at different levels counteracting with the transcriptional activation of tumor-related transcription factors, angiogenesis process and in promotion of apoptosis in combination with chemotherapy, and by induction of cell death in homologous recombination deficient tumor cells (BRCA-1 and 2 deficient cells).

breakage and PARP related cell injury [81, 82]. A considerable number of studies have revealed a crucial role of PARP-1 in cell death after various inflammation processes like ischemia-reperfusion damage, haemorrhagic shock, septic shock, lung inflammation, diabetes mellitus and chronic inflammatory disorders such as arthritis and inflammatory bowel diseases (ulcerative colitis and Crohn's disease), diseases of the central nervous system, such as allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, uveitis, periodontal inflammation, meningitis, asthma and possibly in various forms of dermal inflammation [83]. Experimental evidence supports that Reactive Oxygen Species (peroxynitrite, hydrogen peroxide, nitric oxide, etc) generated during inflammation response, induce DNA strand breakage and PARP activation [83, 84] (Fig. (4)). This activation significantly contributes to the pathophysiology of various forms of inflammation and its inactivation reduced the onset and progression of these illnesses. As will be outline below, different mechanisms have been proposed to explain that the inactivation of PARP-1 (either pharmacologically or using genetically engineered mice lacking PARP-1), improve the outcome of a variety of pathophysiological conditions associated with an exacerbated tissue or systemic inflammation [83].

Mechanisms to explain the role of PARP-1 in the inflammatory response. The first mechanism described is "The suicide hypothesis" in which Berger proposed that the excessive DNA damage induces massive PARP-1 activation that leads to a rapid depletion of NAD<sup>+</sup> and ATP, to an irreversible cellular energy failure, to a drastic reduction of energy dependent processes and to necrotic-type cell death consequent to disruption of oxidative metabolism [84]. This suicide model gained new support in the mid-1990s because after an inflammatory stress (LPS, ischemia-reperfusion injury, etc), different cell types, including macrophages and endothelial cells, activate a massive synthesis of nitric oxide (NO), which is in turn converted into a genotoxic derivative, peroxynitrite that generates single-strand ed DNA breaks and hyperactivation of PARP-1 and depletion of cellular NAD<sup>+</sup> and ATP. Moreover, the peroxynitrite also induces mitochondrial free radical generation that produces more DNA damage and PARP-1 activation and finally causes cell necrosis [85, 86]. It has also been described the PARP-1 activation rapidly modulates the mitochondrial functioning and triggers mitochondrial dysfunction [87-89]. The level of PARP-1 activation has been considered as a molecular switch between necrosis versus apoptosis [90] and the NAD<sup>+</sup> as a metabolic link between DNA damage and cell death [91]. The treatment with NADH or pyruvate blocks PARP-1-mediated cell death [92, 93]. The pathophysiological significance of PARP-1 hyperactivation is well exemplified by the remarkable therapeutic efficacy of PARP-1 inhibitors in experimental models of disorders characterized by DNA damage such as ischemia, diabetes, shock, inflammation and cancer [36, 83] (Fig. (4)).

Recently a key observation on the mechanism by which PARP-1 activation and NAD<sup>+</sup> consumption could lead, under overwhelming DNA damage, to cell death is the pathway that involves the mitochondrial release of apoptosis inducing factor (AIF) and cytochrome c, directly link to the massive synthesis of poly (ADP-ribose), and the activation of a caspase-independent cell death pathway [87, 94-97].

However, several lines of evidence suggest that under specific conditions the beneficial effects of PARP-1 inhibition are independent from the prevention of energy failure [98]. The suicide hypothesis, therefore, might be valid only in conditions of massive DNA rupture and intense PARP-1 activation.

PARP-1 may also influence the stress/inflammation response through regulation of transcription factors and

associated gene transcription. PARP-1 has been reported either to activate or repress transcription activity [5]. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/Rel transcription factors play a central role in the regulation of genes involved in the immune and inflammatory response. NF- $\kappa$ B regulates the expression of TNF- $\alpha$ , iNOS, interleukins IL-1, IL-2, IL-6 and IL-8 as well as the adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin. As has been treated above, reports by different groups, including ours, have shown that PARP-1 inhibitor have minimal or no effect on NF- $\kappa$ B activation, while cells and mice lacking PARP-1 display a dramatic deficiency in this transcription factor activation [34, 36, 40, 41, 51] (Fig. (4)).

These interesting findings have implicated PARP-1 in upstream events of inflammatory signalling (Fig. (4)). PARP inhibitors may affect the signalling pathways and they might play a key role in an inflammatory model as well as a significant role in cell survival. Recent data showed that PARP inhibition-induced Akt activation is dominantly responsible for the cytoprotection in pathophysiological conditions associated with oxidative stress and inflammation [99, 100]. Furthermore, PARP inhibitors down-regulated two elements of the MAP kinase system, ERK 1/2 and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase but not JNK in a tissue-specific manner [40, 101]. However, the exact nature of the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B and MAP kinase by PARP-1 remains to be elucidated.

These beneficial effects of PARP inhibitors probably result from improvement of cellular energetic status leading to cell survival and from inhibition of signal transduction leading to suppressed expression of inflammatory mediators. The contribution of these two mechanisms to the effect of PARP inhibitors in various disease models may likely differ to a great extent.

The marked beneficial effect of PARP inhibitor in many animal models of various diseases suggests that they can be exploited to treat human inflammatory diseases. However, crucial safety experiments must be done, due to the fact that PARP has been involved in DNA repair and maintenance of genomic integrity and its long-term inactivation could increase the possible risk of mutation rate and cancer formation (Fig. (4)).

## CONCLUSIONS

Here we have summarised several independent lines of evidence that are all supporting an involvement of members of the PARP-1 in transcription, carcinogenesis and inflammation (Fig. (4)). As genotoxic stress – mainly induced by ROS – is believed to be the major driving force for tissue damage and inflammation-related carcinogenesis, mechanisms that counteract it or reverse its consequences should be crucial for maintaining genetic integrity. The role of PARP and PAR in cellular physiology has greatly diverged in the last decade. For many years PARP (and more exactly, PARP-1) has been envisaged solely (and importantly) as a protein involved in detection and signalling of DNA damage. The number of PARP/PAR-associated cellular functions currently goes from DNA damage detection and repair to cell death pathways, telomeric function, transcription, chromatin structure, etc., with important consequences in the physiology and pathophysiology of processes such as the control of genome integrity, carcinogenesis, the inflammatory response and neuronal function. The next challenges for this exciting field has to address how these ubiquitous factors can have so many different functions, the insights of the PARPs activation to synthesize the polymer in the absence of DNA damage, the role of the polymer as a signalling molecule in the nucleus and cytosol, and a better understand ing of cellular poly(ADP-

ribosyl)ation duties of other PARP family members, may help to build up a theoretical body of knowledge that will improve the translational applications of PARP(s) as a therapeutic target.

## ACKNOWLEDGMENTS

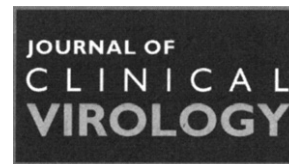
We would like to acknowledge Fundación Hospital Clínico from Hospital Clínico San Cecilio (Granada). This work has been supported by Grants FIS 00/0948, FIS G03/152, SAF: 2003-01217, SAF 2006-01094, La Caixa Oncología 2006 to FJO; SAF:2001-3533 to JMRA and FIS CP03/00142. RAQ from Ministerio de Educación y Ciencia.

## REFERENCES

- Ame, J.C.; Spelnhauer, C.; de Murcia G. *Bioessays*, **2004**, *26*, 882.
- Rolli, V.; O'Farrell, M.; Menissier-de Murcia, J.; de Murcia, G. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 12147.
- Kim, M.Y.; Zhang, T.; Kraus, W.L. *Genes Dev.*, **2005**, *19*, 1951.
- Schreiber, V.; Dantzer, F.; Ame, J.C.; de Murcia, G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2006**, *7*, 517.
- D'Amours, D.; Desnoyers, S.; D'Silva, I. and Poirier, G.G. *Biochem. J.*, **1999**, *342*, 249.
- Ogata, N.; Ueda, K.; Kawaichi, M.; Hayaishi, O. *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 4135.
- Ueda, K.; Kawaichi, M.; Okayama, H.; Hayaishi, O. *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 679.
- Pleschke, J.M.; Kleczkowska, H.E.; Strohm, M.; Althaus, F.R. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 40974.
- Burkle, A. *FEBS J.*, **2005**, *272*, 4576.
- Wielckens, K.; George, E.; Pless, T.; Hiltz, H. *J. Biol. Chem.*, **1983**, *258*, 4098.
- Alvarez-Gonzalez, R.; Althaus, F.R. *Mutat. Res.*, **1989**, *218*, 67.
- Virag, L.; Szabo, C. *Pharmacol Rev.*, **2002**, *54*, 375.
- Malanga, M.; Althaus, F.R. *Biochem. Cell Biol.*, **2005**, *83*, 354.
- Vidakovic, M.; Poznanovic, G.; Bode, J. *Biochem. Cell Biol.*, **2005**, *83*, 365.
- Ame, J.C.; Rolli, V.; Schreiber, V.; Niedergang, C.; Apiou, F.; Decker, P.; Muller, S.; Hoger, T.; Menissier-de Murcia, J.; de Murcia, G. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 17860.
- Schreiber, V.; Ame, J.C.; Dolle, P.; Schultz, I.; Rinaldi, B.; Fraulob, V.; Menissier-de Murcia, J.; de Murcia, G. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 23028.
- Kraus, W.L.; Lis, J.T. *Cell*, **2003**, *113*, 677.
- Kun, E.; Kirsten, E.; Ordahl, C.P. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 39066.
- Oei, S.L.; Shi, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, *284*, 450.
- Kim, M.Y.; Mauro, S.; Gevry, N.; Lis, J.T.; Kraus, W.L. *Cell*, **2004**, *119*, 803.
- Rouleau, M.; Aubin, R.A.; Poirier, G.G. *J. Cell Sci.*, **2004**, *117*, 815.
- Tulin, A.; Spradling, A. *Science*, **2003**, *299*, 560.
- Oei, S.L.; Griesenbeck, J.; Ziegler, M.; Schweiger, M. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 1465.
- Pirrotta, V. *Science*, **2003**, *299*, 528.
- Petermann, E.; Keil, C.; Oei, S.L. *Cell Mol. Life Sci.*, **2005**, *62*, 731.
- Orphanides, G.; LeRoy, G.; Chang, C.H.; Luse, D.S., and Reinberg, D. *Cell*, **1998**, *92*, 105.
- Orphanides, G.; Wu, W.H.; Lane, W.S.; Hampsey, M.; Reinberg, D. *Nature*, **1998**, *400*, 2848.
- Huang, J.Y.; Chen, W.H.; Chang, Y.L.; Wang, H.T.; Chuang, W.T.; Lee, S.C. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, *34*, 2398.
- Ju, B.G.; Lunyak, V.V.; Perissi, V.; Garcia-Bassets, I.; Rose, D.W.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. *Science*, **2006**, *312*, 1798.
- Lis, J.T.; Kraus, W.L. *Cell*, **2006**, *125*, 1225.
- Anderson, M.G.; Scoggin, K.E.; Simbulan-Rosenthal, C.M.; Steadman, J.A. *J. Virol.*, **2000**, *74*, 2169.
- Kannan, P.; Yu, Y.; Wankhade, S.; Tainsky, M.A. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 866.
- Cervellera, M.N.; Sala, A. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 10692.
- Le Page, C.; Sanceau, J.; Drapier, J.C.; Wietzerbin, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, *243*, 451.
- Whitacre, C.M.; Hashimoto, H.; Tsai, M.L.; Chatterjee, S.; Berger, S.J.; Berger, N.A. *Cancer Res.*, **1995**, *55*, 3697.
- Oliver, F.J.; Menissier-de Murcia, J.; Nacci, C.; Decker, P.; Andriantsitohaina, R.; Muller, S.; de la Rubia, G.; Stoclet, J.C.; de Murcia, G. *EMBO J.*, **1999**, *18*, 4446.
- Zingarelli, B.; Hake, P.W.; Burroughs, T.J.; Piraino, G.; O'Connor, M.; Denenberg, A. *Immunology*, **2004**, *113*, 509.
- Kiefmann, R.; Heckel, K.; Doerger, M.; Schenk, S.; Kupatt, C.; Stoekelhuber, M.; Wesierska-Gadek, J.; Goetz, A.E. *Intensive Care Med.*, **2004**, *30*, 1421.
- Ha, H.C.; Hester, L.D.; Snyder, S.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 3270.
- Ha, H.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 5087.
- Martin-Oliva, D.; O'Valle, F.; Munoz-Gamez, J.A.; Valenzuela, M.T.; Nunez, M.L.; Aguilar, M.; Ruiz de Almodovar, J.M.; Garcia del Moral, R.; Oliver, F.J. *Oncogene*, **2004**, *23*, 5275.
- Guermah, M.; Malik, S.; Roeder, R.G. *Mol. Cell Biol.*, **1998**, *18*, 3234.
- Wesierska-Gadek, J.; Schmid, G. *Cell Mol Biol Lett.*, **2001**, *6*, 117.
- Amstad, P.A.; Krupitza, G.; Cerutti, P.A. *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 3952.
- Rawling, J.M.; Alvarez-Gonzalez, R. *Biochem. J.*, **1997**, *324*, 249.
- Butler, A.J.; Ordahl, C.P. *Mol. Cell Biol.*, **1999**, *19*, 296.
- Simbulan-Rosenthal, C.M.; Rosenthal, D.S.; Luo, R.B.; Samara, R.; Jung, M.; Dritschilo, A.; Spoonde, A.; Smulson, M.E. *Neoplasia*, **2001**, *3*, 179.
- Soldatenkov, V.A.; Chasovskikh, S.; Potaman, V.N.; Trofimova, L.; Smulson, M.E.; Dritschilo, A. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *277*, 6650.
- Meisterernst, M.; Stelzer, G.; Roeder, R.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 2261.
- Nie, J.; Sakamoto, S.; Song, D.; Qu, Z.; Ota, K.; and Taniguchi, T. *FEBS Lett.*, **1998**, *424*, 27.
- Hassa, P.O.; Buerki, C.; Lombardi, C.; Imhof, R.; Hottiger, M.O. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 45145.
- Wesierska-Gadek, J.; Wojciechowski, J.; Schmid, G. *J. Cell Biochem.*, **2003**, *89*, 1260.
- Oei, S.L.; Griesenbeck, J.; Schweiger, M.; Babich, V.; Kropotov, A.; Tomilin, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *240*, 108.
- Galante, S.; Kohwi-Shigematsu, T. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, **2000**, *10*, 63.
- Li, M.; Naidu, P.; Yu, Y.; Berger, N.A.; Kannan, P. *Biochem. J.*, **2004**, *382*, 323.
- Griesenbeck, J.; Oei, S.L.; Mayer-Kuckuk, P.; Ziegler, M.; Buchlow, G.; Schweiger, M. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 7297.
- Simbulan-Rosenthal, C.M.; Rosenthal, D.S.; Luo, R.; Samara, R.; Espinoza, L.A.; Hassa, P.O.; Hottiger, M.O.; Smulson, M.E. *Oncogene*, **2003**, *22*, 8460.
- Simbulan-Rosenthal, C.M.; Rosenthal, D.S.; Luo, R.; Smulson, M.E. *Oncogene*, **1999**, *18*, 5015.
- Lam, E.W.-F.; Bennett, J.D.; and Watson, R. *J. Gene*, **1995**, *160*, 277.
- Akiyama, T.; Takasawa, S.; Natta, K.; Kobayashi, S.; Abe, M.; Shervani, N.J.; Ikeda, T.; Nakagawa, K.; Unno, M.; Matsuno, S.; Okamoto, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 48.
- Nirodi, C.; NagDas, S.; Gygi, S.P.; Olson, G.; Aebersold, R.; Richmond, A. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 9366.
- Zhang, Z.; Hildebrandt, E.F.; Simbulan-Rosenthal, C.M.; Anderson, M.G. *Virology*, **2002**, *296*, 107.
- Amiri, K.I.; Ha, H.C.; Smulson, M.E.; Richmond, A. *Oncogene*, **2006**, *25*, 7714.
- Chang, W.J.; Alvarez-Gonzalez, R. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 47664.
- Hassa, P.O.; Hottiger, M.O. *Cell Mol. Life Sci.*, **2002**, *59*, 1534.
- Hassa, P.O.; Covic, M.; Hasan, S.; Imhof, R.; Hottiger, M.O. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 45588.
- Malik, S.; Gu, W.; Wu, W.; Qin, J.; Roeder, R.G. *Mol. Cell*, **2000**, *5*, 753.
- Hassa, P.O.; Haenni, S.S.; Buerki, C.; Meier, N.I.; Lane, W.S.; Owen, H.; Gersbach, M.; Imhof, R.; Hottiger, M.O. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 40450.
- Idogawa, M.; Yamada, T.; Honda, K.; Sato, S.; Imai, K.; Hirohashi, S. *Gastroenterology*, **2005**, *128*, 1919.
- Martin-Oliva, D.; Aguilar-Quesada, R.; O'Valle, F.; Munoz-Gamez, J.A.; Martinez-Romero, R.; Garcia Del Moral, R.; Ruiz de Almodovar, J.M.; Villuendas, R.; Piris, M.A.; Oliver, F.J. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 5744.
- Coussens, L.M.; Werb, Z. *Nature*, **2002**, *420*, 860.
- Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C.J.; Tutt, A.N.; Johnson, D.A.; Richardson, T.B.; Santarosa, M.; Dillon, K.J.; Hickson, I.; Knights, C.; Martin, N.M.; Jackson, S.P.; Smith, G.C.; Ashworth, A. *Nature*, **2005**, *434*, 917.
- Bryant, H.E.; Schultz, N.; Thomas, H.D.; Parker, K.M.; Flower, D.; Lopez, E.; Kyle, S.; Meth, M.; Curtin, N.J.; Helleday, T. *Nature*, **2005**, *434*, 913.
- Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 1620.
- Virag, L.; Szabo, E.; Gergely, P.; Szabo, C. *Toxicol. Lett.*, **2003**, *140*, 113.
- Virag, L.; Salzman, A.L.; Szabo, C. *J. Immunol.*, **1998**, *161*, 3753.
- D'Ambrosio, S.M.; Gibson-D'Ambrosio, R.E.; Brady, T.; Oberyzy, A.S.; Robertson, F.M. *Environ. Mol. Mutagen.*, **2001**, *37*, 46.
- Ischiropoulos, H.; Zhu, L.; Beckman, J.S. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**, *298*, 446.
- Watanabe, N.; Miura, S.; Zeki, S.; Ishii, H. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, *30*, 1019.
- Shacter, E.; Beecham, E.J.; Covey, J.M.; Kohn, K.W.; Potter, M. *Carcinogenesis*, **1998**, *9*, 2297.
- Zhang, J.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M.; Snyder, S.H. *Science*, **1994**, *263*, 687.
- Snyder, S.H. *Nat. Med.*, **1996**, *2*, 965.
- Szabo, C. *Nitric Oxide*, **2006**, *14*, 169.
- Berger, N.A. *Radiat. Res.*, **1985**, *101*, 4.

- [85] Cuzzocrea, S.; Mazzon, E.; Sautebin, L.; Dugo, L.; Serraino, I.; De Sarro, A.; Caputi, A.P. *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, *63*, 785.
- [86] Cuzzocrea, S.; Chatterjee, P.K.; Mazzon, E.; Dugo, L.; Serraino, I.; Britti, D.; Mazzullo, G.; Caputi, A.P.; Thiemermann, C. *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, *135*, 496.
- [87] Cipriani, G.; Rapizzi, E.; Vannacci, A.; Rizzuto, R.; Moroni, F.; Chiarugi, A. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 17227.
- [88] Tanaka, S.; Takehashi, M.; Iida, S.; Kitajima, T.; Kamanaka, Y.; Stedeford, T.; Banasik, M.; Ueda, K. *J. Neurochem.*, **2005**, *95*, 179.
- [89] Xu, Y.; Huang, S.; Liu, Z.G.; Han, J. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 8788.
- [90] Los, M.; Mozoluk, M.; Ferrari, D.; Stepczynska, A.; Stroh, C.; Renz, A.; Herceg, Z.; Wang, Z.Q.; Schulze-Osthoff, K. *Mol. Biol. Cell*, **2002**, *13*, 978.
- [91] Ying, W.; Alano, C.C.; Garnier, P.; Swanson, R.A. *J. Neurosci. Res.*, **2005**, *79*, 216.
- [92] Zhu, K.; Swanson, R.A.; Ying, W. *Neuroreport*, **2005**, *16*, 1209.
- [93] Zeng, J.; Yang, G.Y.; Ying, W.; Kelly, M.; Hirai, K.; James, T.L.; Swanson, R.A.; Litt, L. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2007**, *27*, 304.
- [94] Xiao, C.Y.; Chen, M.; Zsengeller, Z.; Li, H.; Kiss, L.; Kollai, M.; Szabo, C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005**, *312*, 891.
- [95] Hong, S.J.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2004**, *25*, 259.
- [96] Yu, S.W.; Wang, H.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. *Neurobiol. Dis.*, **2003**, *14*, 303.
- [97] Yu, S.W.; Wang, H.; Poitras, M.F.; Coombs, C.; Bowers, W.J.; Federoff, H.J.; Poirier, G.G.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. *Science*, **2002**, *297*, 259.
- [98] Chiarugi, A. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2002**, *23*, 122.
- [99] Veres, B.; Gallyas, F. Jr.; Varbiro, G.; Berente, Z.; Osz, E.; Szekeres, G.; Szabo, C.; Sumegi, B. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *65*, 1373.
- [100] Tapodi, A.; Debreceni, B.; Hanto, K.; Bognar, Z.; Wittmann, I.; Gallyas, F. Jr.; Varbiro, G.; Sumegi, B. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 35767.
- [101] Veres, B.; Radnai, B.; Gallyas, F. Jr.; Varbiro, G.; Berente, Z.; Osz, E.; Sumegi, B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *310*, 247.





## Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon–ribavirin

Javier Salmerón<sup>a,\*</sup>, Jorge Casado<sup>a</sup>, Paloma Muñoz de Rueda<sup>a</sup>, Victor Lafuente<sup>a</sup>, Moises Diago<sup>b</sup>, Manuel Romero-Gómez<sup>c</sup>, Ángel Palacios<sup>a</sup>, Josefa León<sup>d</sup>, Ana Gila<sup>a</sup>, Rosa Quiles<sup>a</sup>, Luis Rodríguez<sup>a</sup>, Angeles Ruiz-Extremera<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Gastroenterology Unit, San Cecilio University Hospital and Ciberehd, Granada, Spain

<sup>b</sup> Section of Hepatology, University General Hospital, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases, Valme University Hospital and Ciberehd, Sevilla, Spain

<sup>d</sup> Fundación Hospital Clínico San Cecilio and Ciberehd, Granada, Spain

<sup>e</sup> Paediatric Unit, San Cecilio University Hospital and Ciberehd, Granada, Spain

Received 13 September 2007; received in revised form 20 November 2007; accepted 29 November 2007

### Abstract

**Background:** The relationship between the complexity of the hypervariable region 1 quasispecies of HCV and responsiveness to therapy is not completely clear.

**Objective:** To investigate the importance of quasispecies as a predictive factor of rapid (RVR), early (EVR) and sustained (SVR) virologic response.

**Methods:** Prospective analysis of 82 patients with chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. Quasispecies (SSCP), HCV-RNA and viral load were determined at baseline and 2, 4, 8 and 12 weeks after beginning treatment.

**Results:** Less fibrosis and lower serum GGT activity were the only predictive factors for EVR. SVR predictive factors were age  $\leq 40$  years, viral load  $\leq 600,000$  IU/mL, and quasispecies  $\leq 5$  bands. By logistic regression analysis, the independent factors determining SVR were age ( $P = 0.011$ ), viral load ( $P = 0.027$ ), and quasispecies ( $P = 0.010$ ). Quasispecies and viral load were not predictive factors of RVR. During treatment, quasispecies decreased rapidly in the SVR group. In non-EVR patients, quasispecies were slightly lower up to 8 weeks and then increased.

**Conclusions:** Quasispecies are an important predictive factor for SVR, but are no better predictors than viral load. Quasispecies are not predictive factors for RVR or EVR.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Early virological response; Peginterferon and ribavirin; Predictive factors; Quasispecies; Sustained virological responses

### 1. Introduction

Administration of pegylated interferons (PEG-IFN) and ribavirin induces a sustained virological response (SVR)

**Abbreviations:** PEG-IFN, pegylated interferons; SVR, sustained virological response; EVR, early virological responses; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; SSCP, single stranded conformational polymorphism; RVR, rapid virological response.

\* Corresponding author at: Hospital Universitario San Cecilio y Ciberehd, Unidad Clínica de Aparato Digestivo, Avd. Dr. Oloriz 16, 18012 Granada, Spain. Tel.: +34 958240719; fax: +34 958284920.

E-mail address: fsalmero@ugr.es (J. Salmerón).

rate of over 55%; however, at least 40% patients do not respond to this treatment (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004; Manns et al., 2001). Identifying factors that predict the response to this antiviral treatment is very important, because PEG-IFN is more expensive than nonPEG-IFN and has significant negative side effects.

It has been shown that early virological response (EVR) to HCV-1 treatment at week 12 has a positive predictive value (PPV) of 65–72% for subsequent SVR (Craxì, 2004; Davis et al., 2003; Fried et al., 2002; Russo and Fried, 2004). Patients with no EVR have no possibility of SVR with a negative predictive value (NPV) of 98–100%. Another important point

in the treatment of HCV is the fourth week of therapy when there is the possibility of an increased SVR with in patients with rapid HCV suppression (Berg et al., 2003; Gavier et al., 1997).

The relationship between quasispecies and SVR has been examined by single stranded conformational polymorphism (SSCP) (Le Guen et al., 1997; Hino et al., 2000; Tang et al., 2002; Yuki et al., 1997). Although results are not consistent, it does appear that fewer than three quasispecies bands is a positive predictive factor for SVR (Salmerón et al., 2006). No data is available on the usefulness of determining quasispecies complexity in genotype HCV-1 patients receiving PEG-IFN plus ribavirin or whether the number of quasispecies bands is a predictive factor of rapid virological response (RVR) and EVR. Recently, Boo et al. (2007) did not find a correlation between baseline viral quasispecies, virological load and final response to treatment, possibly because only 17 patients were studied, among whom six were genotype 3a, a factor known to influence treatment outcome.

In the present study, we investigated the importance of quasispecies number as a predictive factor for RVR, EVR and SVR, in patients with genotype 1 treated with PEG-IFN plus ribavirin for 48 weeks. Quasispecies and qualitative and quantitative HCV-RNA were analysed during treatment.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

We prospectively studied 82 consecutive patients with chronic hepatitis C, genotype HCV-1 who were to receive treatment with PEG-IFN alfa-2a 180 µg/week and ribavirin (1000–1200 mg/day) for 48 weeks. The diagnosis of chronic HCV infection was based on biopsy-proven chronic hepatitis C and permanent detection of serum HCV-RNA. Data collected at baseline on each patient included clinical, biochemical, virological and histological parameters. Virological tests (quasispecies, HCV-RNA and viral load) were performed at 2, 4, 8 and 12 weeks. HCV-RNA analysis was performed at 24, 48 and 72 weeks. The histologic criteria used were based on Scheuer's grading of necroinflammatory activity with slight modifications (Caballero et al., 2001). None of the patients had evidence of liver disease secondary to hepatitis B virus infection, alcohol use, autoimmune disorders or drug toxicity.

Adherence to treatment by all patients was excellent. Only one patient, considered a non-responder, left the study after developing acute pancreatitis. In 11 (13%) patients it was necessary to reduce the PEG-IFN dose because of haematologic side effects, and in 7 (8%), ribavirin dose was reduced because of anaemia.

The following definitions of virological response were used: (1) SVR: absence of detectable HCV-RNA in the serum (<600 IU/mL) at the end of treatment and up to 6 months later; (2) EVR: at week 12, HCV-RNA nega-

tive or  $\geq 2\log_{10}$  decrease; (3) RVR: HCV-RNA negative (<50 IU/mL) at week 4; (4) relapsers: patients who became HCV-RNA negative during therapy, but who became HCV-RNA positive after stopping treatment; (5) non-responders: patients who did not become HCV-RNA negative during therapy. All non-responder patients continued treatment up to 24 weeks.

### 2.2. Ethical consideration

Informed consent to participate was obtained from each patient, and prior approval for the study was obtained from the Ethics Committee of the University Hospital (Granada).

### 2.3. Virologic assays

Viral genotype was determined by reverse hybridisation (Inno-LIPA II HCV Innogenetics SA Ghent, Belgium). HCV-RNA was determined in serum with the Amplicor HCV Kit (Roche Diagnostics System). HCV-RNA serum levels were measured by quantitative RT-PCR with an internal standard (Cobas Amplicor Monitor HCV test v2.0, Roche Diagnostics, cut-off at 600 IU/mL).

#### 2.3.1. Amplification and SSCP analysis of the HCV genomic complexity in the HVR1

HCV-RNA was extracted from 200 µL of serum by the High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, GmbH). The nucleotide sequence of primers used to amplify HCV HVR1 and SSCP analysis of the HCV genomic complexity were performed as described by Salmerón et al. (2006).

### 2.4. Statistical analysis

Quantitative data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and qualitative data as number and percentage. Univariate analysis was performed using the Student's *t*-test or *U* of Mann–Whitney, and the chi-squared or Fisher's exact test. Multivariate analysis was performed using binary logistic regression. A level of statistical significance of 95% was applied for all tests and confidence intervals.

## 3. Results

### 3.1. Baseline characteristics and virological response to treatment

Baseline characteristics and virological response are summarized in Table 1. Seventy-four (90%) patients had EVR at week 12, and 50 (61%) had SVR. The PPV for SVR in patients with EVR at week 12 was 68% (95% CI: 56–78%). The NPV rate for SVR in patients without EVR was 100%. All patients without EVR were HCV-RNA positive at 24 weeks and treatment was stopped at this time.



Table 1  
Baseline clinical, biochemical, virological and histological parameters, and virological response to treatment

	Patients n = 82
Age (year)	
≤40	42 (51)
>40	40 (49)
Sex M/F (% men)	52/30 (63)
Parenteral/non-parenteral transmission	61/17
ALT (U/L)	108 ± 79
AST (U/L)	67 ± 57
GGT (U/L)	72 ± 79
Alkaline phosphatase (U/L)	129 ± 69
Viral load (IU/mL)	
≤6 × 10 <sup>5</sup>	30 (37)
>6 × 10 <sup>5</sup>	52 (63)
Quasispecies bands	
≤5	55 (67)
>5	27 (33)
Inflammation degree	4 ± 2.3
Fibrosis stage	2.13 ± 1.2
Virological response	
EVR at week 12	74 (90)
Non-EVR at week 12	8 (10)
SVR	50 (61)
Non-SVR	32 (39)

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transferase; EVR, early virological responses; SVR, sustained virological response. Data are expressed as means ± S.E.M. or n (%).

### 3.2. Baseline predictive factors for EVR at week 12 and SVR

The EVR predictive factors were related to lower fibrosis stage ( $P=0.076$ ) and lower levels of GGT ( $P=0.039$ ).

Table 2  
Baseline predictive factors of EVR at week 12 and SVR

	Non-EVR n = 8 (10%)	EVR n = 74 (90%)	Non-SVR n = 32 (39%)	SVR n = 50 (61%)
Age (year)				
≤40	4 (50)	38 (51)	10 (31)	32 (64)*
>40	4 (50)	36 (49)	22 (69)	18 (36)
Sex M/F (% men)	4/4 (50)	48/26(65)	18/14 (56)	34/16 (68)
Parenteral/non-parenteral transmission (% parenteral)	6/2 (75)	55/15 (79)	23/9 (72)	38/8 (83)
ALT (U/L)	192 ± 231	105 ± 60	123 ± 129	108 ± 60
AST (U/L)	111 ± 148	62 ± 34	76 ± 78	60 ± 31
GGT (U/L)	130 ± 123	62 ± 65 <sup>†</sup>	86 ± 102	56 ± 46
Alkaline phosphatase (U/L)	128 ± 84	127 ± 65	129 ± 77	126 ± 60
Viral load (IU/mL)				
≤6 × 10 <sup>5</sup>	3 (38)	27 (36)	7 (22)	23 (46) <sup>‡</sup>
>6 × 10 <sup>5</sup>	5 (62)	47 (64)	25 (78)	27 (54)
Quasispecies bands				
≤5	4 (50)	51 (69)	17 (53)	38 (76) <sup>§</sup>
>5	4 (50)	23 (31)	15 (47)	12 (24)
Inflammation grade	4.33 ± 1.8	4 ± 2.3	3.9 ± 2.1	4.2 ± 2.3
Fibrosis stage	2.6 ± 0.8	2 ± 1.1 <sup>  </sup>	2.2 ± 1.1	2 ± 1.1

EVR, early virological responses; SVR, sustained virological response; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transferase. Data are expressed as means ± S.E.M. or n (%). Statistically significant difference between non-EVR and EVR: <sup>†</sup> $P=0.039$ , <sup>‡</sup> $P=0.076$ . Non-SVR and SVR: \* $P=0.004$ , <sup>§</sup> $P=0.022$ , <sup>||</sup> $P=0.032$ .

Serum ALT was lower in the EVR patients, but the difference was not significant (Table 2). The rest of the parameters, including virological factors, were not significantly related to EVR. When baseline variables were compared between SVR and non-SVR groups, we found that the mean age of patients in the SVR group was lower ( $P=0.004$ ). In addition, the virological factors were different, specifically, viral load ≤600,000 IU/mL ( $P=0.022$ ) and quasispecies band ≤5 ( $P=0.032$ ). In contrast, factors related to advanced liver disease (hepatic fibrosis, GGT and ALT) were not statistically significant. By logistic regression analysis, the independent factors for SVR were age ( $P=0.011$ ;  $\delta=3.827$ , 95% CI: 1.3–10.7%), viral load ( $P=0.027$ ;  $\delta=3.723$ , 95% CI: 1.1–11.9%) and quasispecies ( $P=0.010$ ;  $\delta=4.491$ , 95% CI: 1.4–14.07%).

Twenty-nine percent of patients with EVR did not achieve SVR. Sixteen patients experienced relapse (20%), 6 (7%) experienced breakthrough and 2 (2%) were partial responders. When the baseline variables were compared between SVR and EVR-without-SVR groups, the independent factors of SVR were the same as before: age ( $P=0.008$ ;  $\delta=4.794$ , 95% CI: 1.5–15.3%), viral load ( $P=0.028$ ;  $\delta=4.473$ , 95% CI: 1.2–16.9%) and quasispecies ( $P=0.041$ ;  $\delta=3.580$ , 95% CI: 1.05–12.15%). Patients ≤40 years were differentiated from older patients by AST ( $52 \pm 28$  vs.  $81 \pm 70$  U/L,  $P=0.020$ ), hepatic fibrosis ( $1.7 \pm 0.9$  vs.  $2.6 \pm 1.2$ ,  $P=0.001$ ) and SVR (76% vs. 45%,  $P=0.003$ ).

### 3.3. Baseline predictive factors for RVR at week 4

When baseline variables of RVR and non-RVR groups were compared, we did not find any factor predicting RVR

Table 3  
Baseline predictive factors of RVR at week 4

	Non-RVR <i>n</i> = 41 (50%)	RVR <i>n</i> = 41 (50%)
Age (year)		
≤40	20 (48)	22 (52)
>40	21 (52)	20 (47)
Sex M/F (% men)	25/16 (61)	27/14 (66)
Parenteral/non parenteral transmission (% parenteral)	28/11 (72)	33/6 (85)
ALT (U/L)	108 ± 90	119 ± 96
AST (U/L)	57 ± 25	73 ± 71
GGT(U/L)	66 ± 52	70 ± 91
Alkalinephosphatase (U/L)	122 ± 63	132 ± 70
Viral load (IU/mL)		
≤6 × 10 <sup>5</sup>	16 (39)	14 (34)
>6 × 10 <sup>5</sup>	25 (61)	27 (66)
Quasispecies bands		
≤5	27 (66)	28 (68)
>5	14 (34)	13 (32)
Inflammation grade	3.78 ± 2.2	4.4 ± 2.3
Fibrosis stage	2 ± 0.9	2.2 ± 1.2
EVR at week12 and SVR		
EVR	34 (83)	40 (98)*
Non-EVR	7 (17)	1 (2)
SVR	19 (46)	31 (76) <sup>†</sup>
Non-SVR	22 (54)	10 (24)

RVR, rapid virological response; EVR, early virological responses; SVR, sustained virological response; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transferase. Data are expressed as means ± S.E.M. or (percentage). Statistically significant difference between non-RVR and RVR: \**P* = 0.029, <sup>†</sup>*P* = 0.006.

(Table 3). As expected, EVR and SVR were related to RVR (*P* = 0.029 and *P* = 0.006, respectively).

### 3.4. Quasispecies bands during the first 12 weeks

Quasispecies bands decreased rapidly in the SVR group during the first 12 weeks (Fig. 1a). In non-EVR, quasispecies decreased slightly for 8 weeks and thereafter the quasispecies increased. Differences were statistically significant within the SVR group during the first 4 weeks. Patients with EVR-without-SVR had quasispecies band numbers similar to those of the non-EVR group during the first 4 weeks, and the differences were statistically significant from the SVR group. However, after 4 weeks the quasispecies dropped in the non-SVR group.

### 3.5. Viral load during the first 12 weeks

Viral load decreased markedly during the first 8 weeks in SVR (Fig. 1b). In non-EVR patients, the viral load decreased slightly during the first 2 weeks, but later increased and then remained stable until week 12; the differences were statistically significant compared with the SVR group. In the EVR-without-SVR group, the viral load

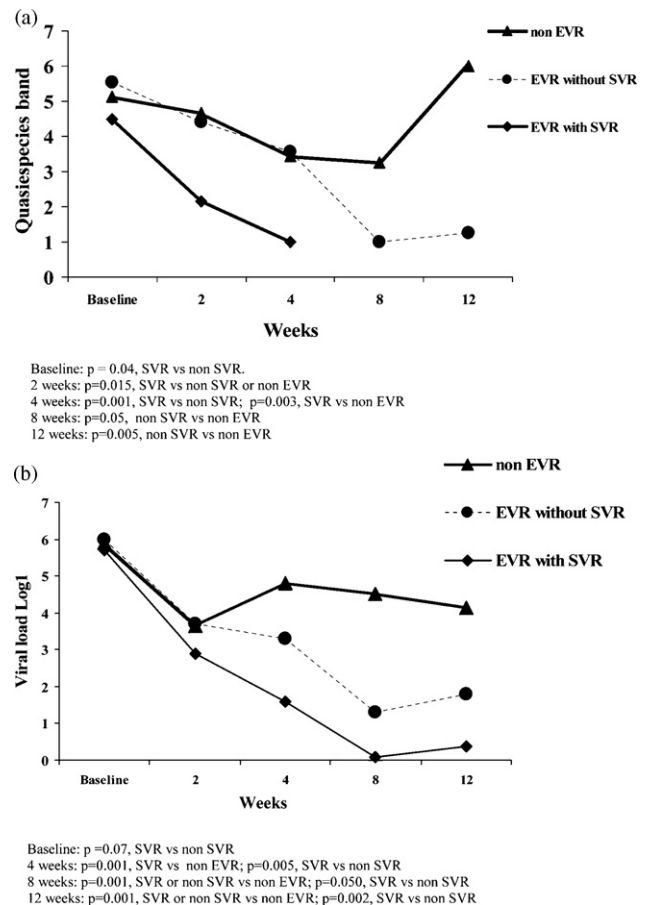


Fig. 1. Quasispecies bands (1a) and viral load (1b) during the first 12 weeks of patients treatment with chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin.

was intermediate between the SVR and non-EVR groups (Fig. 1b).

## 4. Discussion

In this study, the predictive factors for SVR were age ≤40 years, viral load ≤600,000 IU/mL and quasispecies ≤5 bands. The predictive factors for EVR were less fibrosis and lower levels of GGT. Quasispecies correlated with SVR, but not with EVR or RVR.

Determining predictive factors for therapeutic response at baseline is clinically very important. At present, viral genotype is the only predictive factor that determines the treatment duration and ribavirin dose. However, during treatment it is recommended that patients with genotype HCV-1, who fail to achieve EVR at week 12, should be discontinued from therapy. The rate of EVR in HCV-1 patients was high (90%). In the retrospective analysis by Fried et al., 86% had achieved EVR (Fried et al., 2002). Only 10% of patients were non-EVR at 12 weeks, while in another study the corresponding rate was between 14% and 29% (Davis et al., 2003; Fried et al., 2002). In the present study, all non-EVR patients at 12

weeks were HCV-RNA positive at 24 weeks (NPV, 100%). They were then considered non-responders and treatment was discontinued. Although in this study the PPV was 68%, there were patients with EVR who did not achieve SVR (16 relapsers, 6 breakthroughs and 2 partial responders). Finally, a high SVR (61%) was obtained in HCV-1 patients. This rate is better than that reported by Hadziyannis et al. in patients treated for 48 weeks with a higher dose of ribavirin (51%) (Hadziyannis et al., 2004). The likelihood of SVR is increased in patients who maintain the best adherence (McHutchison et al., 2002). Adherence to medical therapy in our study carefully supervised and was excellent.

Baseline predictive factors for EVR at week 12 depend on hepatic lesions such as hepatic fibrosis and GGT, not quasispecies. In all important trials, fibrosis is a significant predictor of treatment resistance (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004; Manns et al., 2001). In contrast, SVR in our study related to virological factors like viral load and quasispecies band. Age is an important factor of SVR as younger patients respond better than older patients (Lee et al., 2002; Poynard et al., 2000). In our study, younger patients were distinguished from older patients by lower AST activity, less hepatic fibrosis and higher SVR rate.

A subset of patients with RVR at 4 weeks are easy to treat, similar to those with HCV-2 or HCV-3 genotypes (Zeuzem et al., 2006). Genotype 1 patients without RVR may become sustained viral responders by extending treatment to 72 weeks (Berg et al., 2006; Sanchez-Tapias et al., 2006). Consequently, it is crucial to know the predictive factors for RVR. In our study 50% of patients with genotype 1 had RVR, a rate similar (47%) to that found by Zeuzem et al. (2006). Unfortunately, we did not find any predictive factor for RVR, and quasispecies were not statistically significant.

Although quasispecies were an independent baseline factor of SVR, it does not improve on simply measuring viral load as a predictor factor (Salmerón et al., 2006). Furthermore, measurement of quasispecies is expensive, laborious and has no standardized technique. As was suspected, quasispecies and viral load decreased rapidly in the SVR group (Fig. 1a and b) during the first 12 weeks of therapy. In the non-EVR group, the curve was flat and the rate of decrease was lower than in the SVR group. This reflected the fact that patients who were early HCV-RNA negative have a greater possibility of SVR. Our patients who were early HCV-RNA negative during the first 8 weeks of treatment had a SVR of around 80%. Among those who were HCV-RNA negative after 8 weeks, the probability of SVR was very low (17%, data not shown).

In summary, quasispecies are an important predictive factor of SVR but are no better than viral load.

### Conflict of interest

None declared.

### Acknowledgements

This study was funded in part by a grant from the “Junta de Andalucía” (no. exp. 265/03) and Ciberehd (no. exp. CBO6/04/0044).

### References

- Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003;37:600–9.
- Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006;130:1086–97.
- Boo I, Fischer AE, Johnson D, Chin R, Giourouki M, Bharadwaj M, et al. Neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C infection treated with (Peg)-interferon/ribavirin. *J Clin Virol* 2007;39(4):288–94.
- Caballero T, Pérez-Milena A, Masseroli M, O'valle F, Salmeron FJ, Del Moral RMG, et al. Liver fibrosis assessment with semiquantitative indexes and image analysis quantification in sustained-responder and non-responder interferon-treated patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:740–7.
- Craxì A. Early virologic response with pegylated interferons. *Digest Liver Dis* 2004;3:S340–3.
- Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon alpha-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:645–52.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves Jr FL, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975–82.
- Gavie B, Martínez-González MA, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Garcia N, Civeira MP, et al. Viremia after one month of interferon therapy predicts treatment outcome in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997;113:1647–53.
- Hadziyannis SJ, Sette Jr H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon- $\alpha$ -2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomised study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Int Med* 2004;140:346–55.
- Hino K, Yamaguchi Y, Fujiwara D, Katoh Y, Korenaga M, Okazaki M, et al. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *J Viral Hepat* 2000;7:36–42.
- Le Guen B, Squadrito G, Nalpas B, Berthelot P, Pol S, Brechot C. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1250–4.
- Lee SS, Heathcote EJ, Reddy KR, Zeuzem S, Fried MW, Wright TL, et al. Prognostic factors and early predictability of sustained viral response with peginterferon alfa-2a. *J Hepatol* 2002;37:500–6.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958–65.
- McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C, et al. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype HCV-1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;123:1061–9.
- Poynard T, McHutchison J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Is an “a la carte” combination of interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C? The AKGIVIRC Project Group. *Hepatology* 2000;31:211–8.

- Russo MW, Fried MW. Guidelines for stopping therapy in chronic hepatitis C. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:17–21.
- Salmerón J, Muñoz de Rueda P, Ruiz-Extremera A, Casado J, Huertas C, Bernal Mdel C, et al. Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C. *Digest Dis Sci* 2006;51(5):960–7.
- Sánchez-Tapias JM, Diago M, Escartín P, Enríquez J, Romero-Gómez M, Bárcena R, et al. Peginterferon-alfa 2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 or treatment. *Gastroenterology* 2006;131:451–60.
- Tang X, Qian K, Yuan X, Johnson YN. Relationship between diversity of hepatitis C virus quasispecies and viremia, activity of liver disease and response to interferon therapy. *Chin J Exp Clin Virol* 2002;16(2):128–31.
- Yuki N, Hayashi N, Moribe T, Matsushita Y, Tabata T, Inoue T, et al. Relation of disease activity during chronic hepatitis C infection to complexity of hypervariable region 1 quasispecies. *Hepatology* 1997;25:439–44.
- Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, et al. Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol* 2006;44:97–103.

## ESSENTIAL ROLE OF PARP-1 IN AUTOPHAGY INDUCED BY CHEMOTHERAPY

**José Antonio Muñoz-Gómez<sup>1#</sup>, José Manuel Rodríguez-Vargas<sup>2#</sup>, Rosa Quiles-Pérez<sup>1</sup>, Rocío Aguilar-Quesada<sup>2</sup>, David Martín-Oliva<sup>3</sup>, Gilbert de Murcia<sup>4</sup>, Josiane Menissier de Murcia<sup>4</sup>, Antonio Almendros<sup>3</sup>, Mariano Ruiz de Almodóvar<sup>5</sup>, F. Javier Oliver<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd) and Laboratory of Medical Research, Academic Hospital San Cecilio, Granada, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain; <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Universidad de Granada, <sup>4</sup>Departement Intégrité du Genome, UMR 7100, CNRS, Strasbourg, France, <sup>5</sup>IBIMER, Universidad de Granada, Spain.

Running Title: *Role of PARP-1 in autophagy*

Address correspondence to: F. Javier Oliver, Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Avda del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain  
Tel.: 34958 181655, Fax: 34958 181632, E-mail: [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es)

**# These authors contributed equally to this study**

# **Inhibition of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Prevents Hepatocellular Carcinoma Growth by Modulation of Tumor-Related Gene Expression**

Rosa Quiles<sup>1\*</sup>, José Antonio Muñoz-Gómez<sup>1\*</sup>, Ángeles Ruiz-Extremera<sup>1</sup>, Paco O'Valle<sup>2</sup>, Laura Sanjuán-Nuñez<sup>1,3</sup>, Ana Belén Martín-Álvarez<sup>1</sup>, Paloma Muñoz de Rueda<sup>1</sup>, Josefa León<sup>1</sup>, Javier Salmerón<sup>1#</sup>, Francisco Javier Oliver<sup>4#</sup>

In hepatic carcinoma (CHC), the damage in DNA together with the inflammatory response and production of oxygen reactive species has an important role. For this reason, both the DNA reparation and the inflammatory mechanism are analyzed to study the new target in cancer therapy. The poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is an important protein that regulates both mechanisms. PAR and PARP-1 have also been described as having a function in transcriptional regulation through their ability to modify chromatin-associated proteins and as a cofactor of different transcription factors, most notably NF-κB, AP-1 and HIF-1α. In the present study, we show that pharmacologic inhibition of PARP-1 with 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyloxy)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone (DPQ) results in a strong reduction in tumor size with regard to tumor xenograft without treatment (394 mm<sup>3</sup> vs. 2148 mm<sup>3</sup>, P<0.05). This observation was parallel with a reduction in the xenograft mitosis together with the tumor vasculogenesis and with an increase of the apoptotic cells in DPQ-treated mice. Using cDNA expression array analysis, a substantial difference in key tumor-related gene expression was found between control tumor xenograft and PARP inhibitor treated xenograft. Most important differences were found in gene

expression for C-MYC, JUND, OPN, VEGFR-1, EPAS1/HIF-2 $\alpha$ , MDM2, HGF and other genes involved in carcinogenesis and inflammation. These results were corroborated by real-time PCR. Finally, *in vitro* angiogenesis study on matrigel showed that the PARP-1 inhibitor reduced significantly the vessel formation. In summary, this study shows that inhibition of PARP on itself is able to control tumor growth and prevents from tumor vasculogenesis through their ability to cooperate with the activation different transcription factor involved in tumor proliferation.

Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; PARP-1, Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1; PAR, Poly (ADP-Ribose); DPQ, 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidiny)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone; NF-kB, nuclear factor-kappa B; AP-1, activator protein 1; HIF1- $\alpha$ , hypoxia-inducible factor 1; OPN, osteopontin; VEGFR-1, vascular endothelial growth factor receptor-1; HGF, hepatocyte growth factor; PCR, polymerase chain reaction; HOXA1, homeobox A1; MDM2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein; ADORA3, adenosine A3 receptor; ANXA3, annexin A3; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; CXCL12, chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1); FFAR1, free fatty acid receptor beta; HUNK, hormonally upregulated Neu-associated kinase; IQGAP1, IQ motif containing GTPase activating protein 1; IRS2, insulin receptor substrate 2; MAP3K7IP2, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2; MAP4K1, MAP4K5, MAP4K10, MAP4K11, mitogen-activated protein kinase 1/5/10/11; MAPKAPK5, mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5; TACSTD2, tumor-associated calcium signal transducer 2; ADAM12, ADAM metallopeptidase domain 12; ANGPTL1, angiopoietin-like 1; s100A6, S100 calcium binding protein A6; EPAS1/Hif-2 $\alpha$ , endothelial PAS domain protein 1, hypoxia-inducible factor 2; ENG, endoglin; EGFR, epidermal growth factor receptor; Nfkbiz, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor zeta, also called MAIL; IL, interleukin; IFI16, interferon, gamma-inducible protein 16; IFNK, interferon kappa; COL4A3, collagen type IV a3; COL4A4, collagen type IV a4; COL4A6, collagen type IV a6; COL6A2, collagen type VI a2; COL8A1, collagen type VIII a1; BCL-2L10, Bcl2-like 10; CCAR1, cell division cycle and apoptosis regulator 1; PDCD4,

## **BLOCKADE OF PARP ACTIVATION COUNTERACTS THE INITIAL EVENTS OF HEPATOCARCINOGENESIS AND INHIBITS ANGIOGENESIS**

Rosa Quiles-Pérez<sup>1</sup>, Ángela Ruiz-Extremera<sup>1</sup>, José Antonio Muñoz-Gómez<sup>2</sup>, Andreína Paralta<sup>3</sup>, Trinidad Caballero<sup>4</sup>, Rocío Aguilar-Quesada<sup>3</sup>, David Martín-Oliva<sup>5</sup>, Paloma Muñoz-Rueda<sup>1</sup>, Javier Salmerón<sup>1</sup>, F. Javier Oliver<sup>3</sup>

1. Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain
2. IBIMER, Universidad de Granada, Spain
3. Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Armilla, Granada, Spain
4. Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Spain
5. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

### **Abstract**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent neoplasm worldwide, but owing to the lack of effective treatment options, represents the third leading cause of cancer death. PARP inhibition has been shown to have a beneficial effect in multiples inflammatory and neoplastic pathologies. In the present study we show that inhibition of PARP sensitizes the human HCC cell line hepG2 to DOXO (doxorubicin)-induced cell death, and more importantly, it has no cytotoxic effect on the normal hepatocyte cell line WRL. *In vivo* we have treated mice with diethyl-nitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and we have found that treatment with the PARP inhibitor DPQ in the initial steps of carcinogenesis. Pre-neoplastic markers (GSTm3, VEGF, and osteopontin) gene expression, BrdU incorporation and NF- $\kappa$ B activation were reduced. Additionally, we have shown that PARP inhibition affects the *in vitro* and *in vivo* ability of neovascularisation demonstrating a strong reduction on tube formation on HUVEC cells without affecting cell viability. Altogether, this results show that inhibition of PARP has a beneficial effect in the prevention HCC development and could be considered as a potential anti-angiogenic therapeutic target.



**Prospective studies of mutations in the E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR and NS5A-V3 regions of hepatitis C virus genotype 1 and their relationship to peginterferon and ribavirin treatment response**

P. Muñoz de Rueda, J. Casado, A. Palacios, D. Quintero, R. Paton, A. Gila, R. Quiles, J. León, A. Ruiz-Extremera, J. Salmerón\*.

San Cecilio University Hospital, Gastroenterology Unit, Ciberehd, Granada, Spain.

**\*Corresponding author:**

Dr. Javier Salmerón. Hospital Universitario San Cecilio, Ciberehd, Unidad Clínica de Aparato Digestivo, Avd. Dr. Oloriz,16, 18012 Granada.

E-Mail: [fsalmeronescobar@sepd.es](mailto:fsalmeronescobar@sepd.es) Tel: 034 958240719, Fax: 034 958284920

## **Abstract**

**Background:** Mutations in several subgenomic regions have been implicated in influencing response to IFN therapy.

**Aim:** To study the mutations in the E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR and NS5A-V3 regions in HCV genotype 1 patients treated with peginterferon plus ribavirin.

**Patients and Methods:** The sequence of the PKRBD (including ISDR) and V3 regions, for the dominant variant of HCV, was determined in pretreatment serum of 60 patients genotype 1 (1b, n=47 and 1a, n=13). They were classified as either sustained virologic response (SVR, n=36) or non responders (NR, n=24). Additionally, the sequence of the E2-PePHD region was determined in 23 patients (11 SVR and 12 NR).

**Results.** 89% patients with >4 mutations in PKRBD were SVR, versus 46% with  $\leq 4$  mutations (P=0.001). In ISDR the difference was almost statistically significant (SVR: 68% with mutations vs 45% without mutations, P=0.07). The V3 region had a very high genetic variability, but this was not related with SVR. Finally, the E2-PePHD (n=23) region was well conserved. >4 mutations in PKRBD (OR=9.9; P=0.006) and an age  $\leq 40$  years (OR=3.2; P=0.056) were selected in multivariate analysis as predictive factors of SVR. NS5A sequences from 1 month treatment and post-treatment serum were examined in 3 SVR and 15 NR to select treatment-resistant viral subpopulations, and it was found that in the V3 and flanking regions, the mutations increased significantly in post-treatment sera (P=0.05).

**Conclusions.** The genetic variability in PKRBD (> 4 mutations) is a predictive factor of SVR in HCV genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin.

**Keyword:** Mutations, PKRBD, ISDR, V3, HCV, pegIFN and ribavirin.



## **COMUNICACIONES A CONGRESOS**



AUTORES/AS: A. RUIZ EXTREMERA, P. MUÑOZ DE RUEDA, A. GILA, R. DAZA, **R. QUILES**, P. ROMERO, V.M. LAFUENTE, F. GARCÍA, D. QUINTERO, J. SALMERÓN  
TÍTULO: Genotipo del virus de la hepatitis B y la respuesta al tratamiento con interferón y lamivudina  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: XXX Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid, España  
AÑO: 2005

AUTORES/AS: **R. QUILES**, A. RUIZ EXTREMERA, P. MUÑOZ DE RUEDA, J. CASADO, T. CABALLERO, J. SALMERÓN.  
TÍTULO: Función de la PARP-1 en el desarrollo y tratamiento del hepatocarcinoma  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral.  
CONGRESO: Primeras Jornadas Andaluzas de Hepatología (GAEH)  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España  
AÑO: 2006

AUTORES/AS: **R. Quiles**, A. Ruiz-Extremera, J. Salmerón, T. Caballero, P. Muñoz de Rueda, J. Casado y F.J. Oliver.  
TÍTULO: FUNCTION OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE-1 (PARP-1) IN THE DEVELOPMENT AND TREATMENT OF HEPATOCELLULAR  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: Biology and Pathophysiology of Poly (ADP-ribosylation)  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España  
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D, Aquilar-Quesada R, **Quiles-Pérez R**, Martínez-Romero R, Nuñez MI, Ruíz de Almodóvar JM, Oliver FJ.  
TÍTULO: Role of PARP-1 in autophagic-like cell death induced by doxorubicin.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: : Biology and Pathophysiology of Poly (ADP-ribosylation)  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España  
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Aguilar-Quesada Rocío, Martín-Oliva David, Muñoz-Gómez Jose Antonio, **Quiles-Pérez Rosa**, Martínez-Romero Rubén, Peralta-Leal Andreína, Ruíz de Almodóvar J.M, Oliver F.J.  
TÍTULO: Sensibility of ATM-deficient cells to PARP inhibitors.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: : Biology and Pathophysiology of Poly (ADP-ribosylation)  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España  
AÑO: 2006

AUTORES/AS: Muñoz-Gómez J. A, Martín-Oliva D, O'Valle Ravassa F, Aguilar-Quesada R, **Quiles-Pérez R**, Martínez-Romero R, Peralta-Leal A, Ruíz de Almodóvar J.M, García del Moral R, Oliver F.J.  
TÍTULO: PARP-1 as a regulator of hypoxic response and autophagic cell death.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral  
CONGRESO: : Biology and Pathophysiology of Poly (ADP-ribosylation)  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España  
AÑO: 2006

AUTORES/AS: J. Salmerón, J. Casado, L. Rodríguez, P. Muñoz de Rueda, V. Lafuente, M. Diago, M. Romero, D. Quintero, **R. Quiles** y A. Ruiz Extremera.

TÍTULO: ESTUDIO DE LOS FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA VIROLÓGICA PRECOZ Y RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA EN LOS PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C, GENOTIPO 1, TRATADOS CON INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: XXXI Congreso Anual de la Fundación y Asociación para el Estudio del Hígado.

PUBLICACIÓN: Gastroenterol.Hepatol. 2006; 29(Supl.1):113-74

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid, España

AÑO: 2006

AUTORES/AS: **R. Quiles**, A. Ruiz-Extremera, J. Salmerón, T. Caballero,

P. Muñoz de Rueda, J. Casado y F.J. Oliver.

TÍTULO: FUNCIÓN DE POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA-1 (PARP-1) EN EL DESARROLLO Y EL TRATAMIENTO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: XXXI Congreso Anual de la Fundación y Asociación para el Estudio del Hígado.

PUBLICACIÓN: Gastroenterol.Hepatol. 2006; 29(Supl.1):113-74

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid, España

AÑO: 2006

AUTORES/AS: **R. Quiles**, A. Ruiz-Extremera, J. Salmerón, T. Caballero,

P. Muñoz de Rueda, J. Casado y F.J. Oliver.

TÍTULO: FUNCTION OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE-1 (PARP-1) IN THE DEVELOPMENT AND TREATMENT OF HEPATOCELLULAR

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: 41<sup>ST</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Viena, Austria

AÑO: 2006

AUTORES/AS: **Quiles R.**, Oliver FJ., Muñoz-Gómez JA., Caballero T., León J., Zúñiga B., Ruiz-Extremera A., Salmerón J.

TÍTULO: Estudio de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) en el desarrollo y el tratamiento del carcinoma hepatocelular.

TIPO DE PARTICIPACIÓN Póster:

CONGRESO: LXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España

AÑO: 2006

AUTORES/ S: Candel JM., Casado J., Gila A., Muñoz de Rueda P., **Quiles R.**, Andrade R., Diago R., Navarro J., Salmerón J

TÍTULO: Estudio de las tasas plasmáticas de ribavirina en pacientes con hepatitis C crónica, genotipo 1, tratados con interferon pegilado y ribavirina.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: LXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España

AÑO: 2006

AUTORES/AS: León J., Muñoz de Rueda P., Mundi JL., Casado J., **Quiles R.**, García J., García A., Ruíz-Extremera A., Salmerón J.

TÍTULO: Implicación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el desarrollo del cáncer de colon: utilidad de los inhibidores simultáneos del enzima convertidor de endotelina-1 (ECE-1) y de la óxido nítrico sintasa inducible (INOS).

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: LXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, España

AÑO: 2006

AUTORES/AS: Javier Salmerón, Paloma Muñoz de Rueda, Luís Rodríguez, José Manuel Candel, **Rosa Quiles**, Raúl Andrade, Moisés Diago, José María Navarro.

TÍTULO: PLASMA RIBAVIRIN QUANTIFICATION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C, GENOTYPE 1, TREATED WITH PEGINTERFERON AND RIBAVIRIN.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster

CONGRESO: 57<sup>ST</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver diseases

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Boston, EE.UU.

AÑO: 2006

AUTORES/AS: **Rosa Quiles-Pérez**, Angela Ruiz-Extremera, Jose Antonio Muñoz-Gámez, Trinidad Caballero, Rocío Aguilar Quesada, David Martín Oliva, Javier Salmerón, F.J. Oliver.

TÍTULO: POTENCIACIÓN DE LA MUERTE CELULAR DE HEPATOCITOS TUMORALES POR INHIBIDORES DE PARP: IMPLICACIÓN EN LA HEPATOCARCINOGENÉISIS.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral.

CONGRESO: VIII APOReunión.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Girona, España

AÑO: 2007

AUTORES/AS: J. Casado, P. Muñoz de Rueda, A. Gila, R. Patón, D. Quintero, L. Rodríguez, J. León, **R. Quiles**, A. Ruiz-Extremera y J. Salmerón.

TÍTULO: ESTUDIO PROSPECTIVO DE LAS MUTACIONES EN LAS REGIONES E2-PEPHD, NS5-PKRBD, NS5A-ISDR Y NS5A-V3 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) GENOTIPO 1, Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INTERFERON PEGILADO (IFN-PEG) Y RIBAVIRINA (RBV).

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral.

CONGRESO: XXXII Congreso Anual de la Fundación y Asociación para el Estudio del Hígado.

PUBLICACIÓN: Gastroenterol.Hepatol. 2007; 30(Supl.1):129

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid, España

AÑO: 2007

AUTORES/AS: MUÑOZ-GAMEZ JA, RODRIGUEZ-VARGAS JM, **QUILES-PEREZ R**, MARTÍN-OLIVA D, AGUILAR-QUESADA R, NUÑEZ MI, JM RUIZ DE ALMODÓVAR, FJ OLIVER.

TÍTULO: PARP-1 IS INVOLVED IN AUTOPHAGY INDUCED BY DOXORRUBICIN

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: XI Congreso de ASEICA (Asociacion Española de Investigacion sobre el Cancer).

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Las Palmas de Gran Canaria, España

AÑO: 2007



AUTORES/AS: JA Muñoz-Gámez, JM Rodríguez-Vargas, M López Rodríguez, R Aguilar Quesada, A Peralta Leal, **R Quiles Pérez**, D Martín Oliva, J Ruiz De Almodóvar, FJ Oliver.  
TÍTULO: ESSENTIAL ROLE OF PARP-1 IN AUTOPHAGY INDUCED BY CHEMOTHERAPY  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral  
CONGRESO: XXX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Málaga, España  
AÑO: 2007

Autores: A. Peralta-Leal, D. Martín-Oliva, **R. Quiles**, JA. Muñoz-Gámez, R. Aguilar-Quesada, M López-Rodríguez, JM Rodríguez-Vargas, JM Ruiz de Almodovar, FJ. Oliver  
Título: DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA-1.  
Tipo de participación: Comunicación oral.  
Congreso: XII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular.  
Lugar de Celebración: 2-5 Julio de 2007. Navarra, España.

Autores: **R. Quiles**, JA Muñoz-Gámez, Ángela Ruiz-Extremera, Ana Belén Martín-Álvarez, Laura Sanjuán-Nuñez, José Manuel Rodríguez-Vargas, Andreína Peralta-Leal, Paloma Muñoz de Rueda, Francisco Javier Oliver, Javier Salmerón  
Título: Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), nueva diana en el tratamiento del carcinoma hepatocelular  
Tipo de participación: Comunicación oral  
Congreso: XXXIII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado  
Lugar de Celebración: 20-22 de Febrero 2008, Madrid, España.

Autores: A. Gila, A. Palacios, A. García, S. Delgado, T. Caballero, L. Rodriguez, **R. Quiles**, JA Muñoz-Gamez, I. García Tercero, JL. Mundi, A. Ruiz Extremera, J. Salmerón.  
Título: ¿Es necesario una nueva clasificación histológica de las lesiones hepáticas en la obesidad morbida?  
Tipo de participación: Comunicación oral  
Congreso: XXXIII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado  
Lugar de Celebración: 20-22 de Febrero 2008, Madrid, España.  
Madrid

