



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**Reposicionamiento farmacéutico del ribavirín
en linfomas no Hodgkin**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

DOMINIQUE CORTÉS PEDROZA

TUTOR

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Febrero de 2017

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Alfonso Dueñas González, en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y del Instituto Nacional de Cancerología.

Agradezco la asesoría de la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez durante la realización de este trabajo.

Aprovecho para agradecer a la biblioteca del Instituto de investigaciones biomédicas de la UNAM y en particular a la Lic. Lucía Brito Ocampo, que me brindaron todo el material y facilidades para mis estudios

Agradezco al Instituto de Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y a la Facultad de Medicina por todas las facilidades que se me otorgaron durante la carrera.

Durante toda la carrera fui acreedor de la beca “Programa de becas de inicio a la investigación (PROBEI) por la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (CCINSHAE), Secretaría de Salud (Septiembre 2014 a Febrero 2015).

Durante mis estudios de licenciatura, el Dr. Alfonso Dueñas gestionó el apoyo económico de ayudante de investigador Nacional III otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores-Conacyt (Septiembre 2015 a Agosto 2016).

Estoy infinitamente agradecido con mi alma mater Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme lograr una meta más en mi vida.

Agradecimientos

A mis padres **Elba** e **Iván** por enseñarme con el ejemplo que las metas y sueños se logran a base de sacrificios y trabajo duro. Por el inmenso e inquebrantable amor, cariño y apoyo incondicional que me han demostrado hoy y siempre.

A mis hermanos **Yasser** y **Jairo** por aconsejarme, protegerme y motivarme en todo lo que hago y en todo momento de mi vida.

A mi abuelita **Rosita** por darme tanto amor y motivarme desde parvulito a ser una gran persona y siempre dar lo mejor de mí en todo y para todos.

A mi tío **Ricardo** que me apoyó en el inicio de esta aventura.

A todos mis tíos y primos por siempre tener la mejor imagen de mí.

A mis queridos profesores de la prepa: **Diana, Lara, Azcorra y Araceli Pompa** por prepararme y motivarme a ingresar al camino de la investigación.

A **Lupita** por ser una gran asesora, guiarme, apoyarme y no desistir durante este proyecto. Por regañarme y preocuparse por mí como estudiante y persona. Por ser mi asesora, amiga y mamá académica en una sola persona.

A mis amigos de la carrera: **Andrea, Adrián, Jorja y Robert Charles** por todas las risas, alegrías, pizzas, pláticas y buenos momentos compartidos en la carrera.

A mis amigos **Paco, Rachi, Raúl, Efra, Julio, Emanuel** por ser la bandota locota.

A mis queridísimos amigos “**Tiernos**” **Ana, Ale, Janín y Cristian** por apoyarme desde el ingreso a la UNAM y durante la carrera. Por ser unos excelentes amigos.

A mi hermano **R Gran Negro** por ser la mejor esquina hoy y siempre.

A mis compañeros y adscritos del **laboratorio 6** por hacer mi estancia grata y agradable durante este período de mi vida. Gracias por aguantarme.

A la **Dra. Julieta** y al **Dr. Zentella** por las excelentes enseñanzas dentro y fuera del aula. Por las pláticas, risas y consejos compartidos.

Índice

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	6
1.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	7
1.1-Linfomas.....	7
1.2-Linfomas no Hodgkin.....	8
1.2-Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).....	10
1.3-Linfoma cutáneo de células T (LCCT)	14
1.4-Epigenética.....	19
1.5-EZH2 y su papel en el cáncer.....	21
1.6-Terapia epigenética dirigida a EZH2.....	24
1.7-Reposicionamiento terapéutico.....	28
1.8-Antecedentes directos.....	30
2.- <u>JUSTIFICACIÓN</u>	32
3.- <u>HIPÓTESIS</u>	33
4- <u>OBJETIVO</u>	33
5- <u>OBJETIVOS PARTICULARES</u>	33
6- <u>METODOLOGÍA</u>	34
7- <u>RESULTADOS</u>	39
7.1-Ribavirín inhibe la proliferación celular de linfoma no Hodgkin.....	39
7.2-El tratamiento con ribavirín inhibe la capacidad clonogénica de células de linfoma no Hodgkin.....	41
7.3-Ribavirín no afecta los niveles de la proteína EZH2 en líneas celulares de linfoma no Hodgkin.....	42
7.4-Ribavirín no afecta los niveles de H3K27me3 en linfoma No Hodgkin.....	43
8- <u>DISCUSIÓN</u>	44
9- <u>CONCLUSIÓN</u>	47
10- <u>PERSPECTIVAS</u>	47
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	48

Lista de abreviaturas

CG: Centro germinal.

CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona.

DNA: por las siglas en inglés de Ácido desoxirribonucleico.

DZNep: 3-Deazaneplanocin A.

EORTC: Organización europea para la investigación y tratamiento del cáncer.

HATs: Acetil transferasas de histonas.

HDACs: Desacetilasas de histonas.

HMTs: Metiltransferasas de histonas.

H3K27: lisina 27 de la histona 3.

H3K27me2: Dimetilación de la lisina 27 de la histona 3.

H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 de la histona 3.

LCCT: Linfoma cutáneo de células T.

LDCBG: Linfoma difuso de células B grandes.

LHc: Linfoma de Hodgkin clásico.

LHNPLN: Linfoma de Hodgkin con predominio linfocitario nodular.

LNH: Linfoma(s) no Hodgkin.

L&H: Linfocíticas e histiocíticas.

MF: Micosis fungoide.

OMS: Organización mundial de la salud.

PRC2: Complejo represor Polycomb 2.

R-CHOP: Rituximab + CHOP.

RNA: por las siglas en inglés de Ácido ribonucleico.

SAM: S-Adenosilmetionina

SS: Síndrome de Sézary.

“Reposicionamiento farmacéutico del ribavirín en linfomas no Hodgkin”

Resumen

Introducción: El ribavirín es un antiviral de amplio espectro que ha demostrado que disminuye la proliferación celular a través de la inhibición de la expresión de la metiltransferasa de histonas EZH2, así como su actividad metiltransferasa y los niveles de la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) en células de carcinoma mamario MCF-7. En este trabajo se demostró que ribavirín inhibe el crecimiento celular de la línea de cáncer de próstata PC-3 y disminuye los niveles de la proteína EZH2, así como de sus blancos eIF4E e IMPDH1 y 2. Interesantemente, un estudio computacional reveló que el ribavirín, tiene una similitud estructural con el fármaco 3-deazaneplanocin A (DZNep) uno de los primeros inhibidores de EZH2. Por otro lado, se ha reportado que EZH2 se encuentra sobreexpresada en cáncer de vejiga, colon, piel, hígado, endometrio, pulmón, gástrico, linfoma y mieloma. EZH2 tiene como función monometilar H3K27, sin embargo, al estar mutada adquiere una ganancia de función que resulta en la trimetilación de H3K27, una marca de represión transcripcional implicada en el proceso oncogénico.

El “reposicionamiento farmacéutico” es una nueva estrategia para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales a través del re-descubrimiento de fármacos descritos y utilizados en otros padecimientos, que pudieran tener un efecto en cáncer. Por lo que consideramos evaluar el efecto de ribavirín como inhibidor de la actividad de EZH2 en linfomas no Hodgkin.

Metodologías: Se analizó el efecto del tratamiento con ribavirín a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 μ M) por 24, 48 y 120 horas sobre la viabilidad de las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfomas no Hodgkin a través de ensayos de viabilidad mediante exclusión con azul de tripano y un contador electrónico. Posteriormente se analizó el efecto del ribavirín a largo plazo mediante ensayos clonogénicos. Y finalmente, se determinó si el ribavirín tiene efecto en los niveles de EZH2 y en la trimetilación de la H3K27 mediante western blot.

Resultados: Los resultados demostraron que el ribavirín disminuye significativamente la viabilidad las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin. Así como también se observó una disminución en la capacidad clonogénica de manera significativa en Hut78 y de forma más evidente en células Pfeiffer. Finalmente se observó que el tratamiento con ribavirín no afecta los niveles de la proteína EZH2 ni de la trimetilación de H3K27 en este modelo biológico.

Discusión y Conclusión: Estos resultados demuestran que el tratamiento con ribavirín disminuye la viabilidad y capacidad clonogénica de las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo; sin embargo, nuestros resultados sugieren que el mecanismo de acción descrito para ribavirín en células MCF-7 y PC3 no fue el observado en células de linfoma No Hodgkin. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el ribavirín podría estar regulando otros blancos implicados en la regulación de la proliferación celular y sería importante identificar qué vías están siendo afectadas por el tratamiento.

Introducción

1.1.-Linfomas

Los linfomas son un grupo de neoplasias que comienza en las células que son parte del sistema inmune, llamadas linfocitos B o T, los cuales se encuentran alojados en el sistema linfático (Figura 1). Existen dos tipos de linfomas: los linfomas de Hodgkin (nombrado así por su descubridor, el Dr. Thomas Hodgkin) y linfomas No Hodgkin.

Los linfomas de Hodgkin se originan en los ganglios linfáticos de la parte superior del cuerpo con mayor frecuencia en el tórax, el cuello o debajo de los brazos. Todos los tipos de linfomas de Hodgkin son malignos porque, a medida que crecen, pueden propagarse a otros tejidos (Casulo et al., 2013).

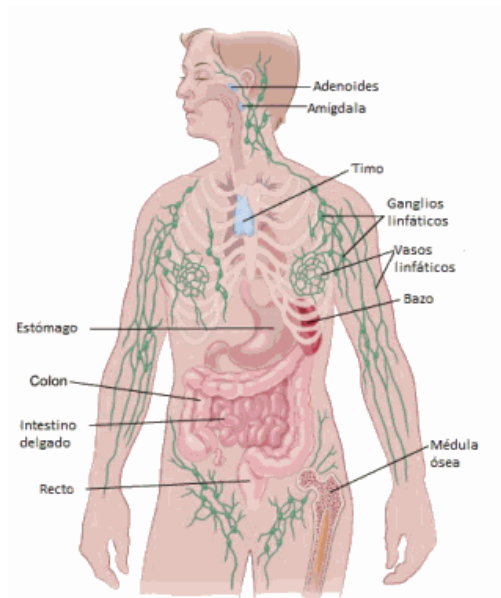


Figura 1. Esquema anatómico del sistema linfático humano.

Los linfomas de Hodgkin pueden clasificarse de acuerdo a su patología en:

- Linfoma de Hodgkin clásico (LHc)
- Linfoma de Hodgkin con predominio linfocitario nodular (LHPLN)

El LHc se caracteriza por tener un pequeño número de células Reed-Stemberg (HRS), (apellidos de los médicos que las describieron por primera vez), las cuales son un tipo anormal de linfocitos B de gran tamaño, y un gran número de células inmunológicas normales circundantes, sin embargo, esta pequeña población es la causante de la inflamación en los ganglios.

Por otro lado, el LHPLN presenta células linfocíticas e histiocíticas (L&H) las cuales representan < 1% de las células del tumor. Ambas células tumorales son derivadas del centro germinal (CG) de células B, pero son genética, morfológica y fenotípicamente diferentes (Mathas et al., 2016).

Linfomas no Hodgkin

Los linfomas no Hodgkin (LNH) son un grupo heterogéneo de neoplasias de diferente origen biológico y pronóstico. En comparación con los linfomas de Hodgkin, los LNH se generan en los nódulos linfáticos, así como también en diferentes órganos. Los LNH incluyen diversos subtipos cada uno con diferente epidemiología, genética, características clínicas y respuesta a terapia. En la tabla 1 se muestra la clasificación, de los diferentes tipos de LNH basada en la morfología y linaje celular (Swerdlow et al.,2008). Como se puede observar en la tabla 1 dentro de las categorías de células B o T existen dos subdivisiones:

neoplasias precursoras y neoplasias maduras diferenciadas (Swerdlow et al, 2008).

Tabla 1. Clasificación de linfomas no Hodgkin según la OMS. Modificado de Swerdlow et al, 2008.

	Linfomas de células B	Linfomas de células T
Neoplasias de precursoras de células B o T	Linfoma de precursores de células B	Linfoma de precursores de células T
Neoplasias de células periféricas (Maduras)	Leucemia linfática crónica B/Linfoma linfocítico bien diferenciado	Leucemia prolinfocítica T
	Leucemia prolinfocítica	Leucemia T de linfocitos granulares
	Linfoma linfoplasmablastico	Leucemia de células NK agresiva
	Linfoma esplénico marginal (linfocitos vellosos)	Leucemia/linfoma T adulto (HTLV-1)
	Leucemia de células peludas	Linfoma extranodal NK/T (nasal)
	Plasmocitoma/Mieloma	Linfoma enteropático
	Linfoma de zona B marginal extranodal (MALT)	Linfoma hepatoesplénico
	Linfoma de células del manto	Paniculitis subcutánea
	Linfoma folicular (I, II y III)	Micosis fungoide/ síndrome de Sezary (Linfoma cutáneo de células T)
	Linfoma de zona B marginal nodal	Linfoma anaplásico, tipo cutáneo primario
	<i>Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG)</i>	Linfoma T periférico
	Linfoma de Burkitt	Linfoma angioinmunoblástico
		Linfoma anaplásico tipo sistémico

Datos epidemiológicos reportados por la organización mundial de la salud (OMS) indican que el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG, tabla 1) es el subtipo de LNH más común ya que conforma el 25% de todos los linfomas (Swerdlow et al., 2008).

Interesantemente otro tipo de linfoma que representa aproximadamente el 50% de los linfomas primarios que se presentan en la piel es el linfoma cutáneo de células T (LCCT) (Swerdlow et al., 2008). Con base en lo anterior se considera que ambos linfomas podrían ser un buen modelo de estudio debido a su alta incidencia en pacientes con linfoma.

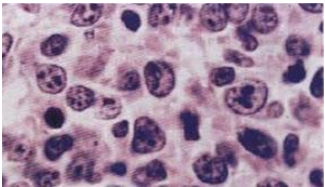
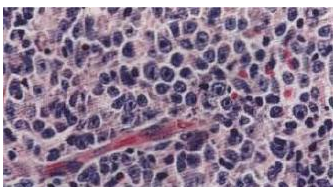
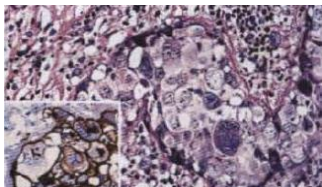
Linfoma difuso de células B grandes

El LDCBG se define como un grupo heterogéneo de células linfoides que proliferan de manera difusa en vez de nodular. Estas células tienen núcleo celular de gran tamaño, generalmente más grande que el núcleo de un macrófago o el doble del núcleo de un linfocito normal y contienen marcadores de células B (Caimi et al, 2016; Swerdlow et al., 2008). Los factores de riesgo más comunes relacionados con el LDCBG son el síndrome de inmunodeficiencia e infecciones con el virus de Epstein-Barr (Hummel, et. Al. 1995).

Las células de LDCBG presentan marcadores de células B como CD19, CD20, CD22 y CD79a. El 70% de los casos tienen inmunoglobulinas M, G y/o A en la membrana celular o citoplasma (Swerdlow et al., 2008). En un estudio se observó que el 50% de los casos de LDCBG presenta una co-expresión de los marcadores IRF4/MUM1 y BCL6 (Falini et al., 2013). En otros estudios se han reportado varios marcadores asociados a un pronóstico negativo, algunos de ellos son BCL2, inhibidor de la apoptosis, ligado al cromosoma X, IRF4/MUM1, ciclina D2, ciclina D3, p53, CD5, FOXP1, PKC- β , ICAM1, HLA-DR, c-FLIP (Swerdlow et al., 2008).

Más del 40% de los pacientes con LDCBG han presentado esta neoplasia localizada en los nódulos linfáticos o de manera extranodal. El sitio extranodal más común es el tracto gastrointestinal, sin embargo, cualquier órgano extranodal puede generar un tumor primario de LDCBG, por ejemplo: piel, sistema nervioso central, hueso, testículo, glándulas salivales, tracto genital femenino, pulmón, riñón, hígado, anillo de Waldeyer y bazo. Interesantemente se ha reportado que cada sitio extranodal presenta variantes morfológicas de esta neoplasia y todas éstas pueden contener un gran número de células T e histiocitos. Las tres variantes morfológicas más comunes son la centroblástica, inmunoblástica y la anaplásica (Swerdlow et al., 2008) (tabla 2).

Tabla 2. Histología de variantes morfológicas del LDCBG. Panel 1.) Apariencia típica de la variante centroblástica de LDCBG donde se puede apreciar el núcleo con vesículas. Panel 2. variante inmunoblástica con el nucléolo centrado y Panel 3. variante anaplásica con el característico núcleo pleomórfico.

<i>Centroblástica</i>	<i>Inmunoblástica</i>	<i>Anaplásica</i>
es la variante más común y se compone de células linfáticas ovaladas con núcleo vesicular con cromatina fina, con citoplasma escaso, anfófilo y en algunas ocasiones las células pueden ser multilobuladas (Swerdlow et al., 2008).	Más del 90% de esta variante son inmunoblastos con un solo nucleolo centrado y un citoplasma notable (Swerdlow et al., 2008).	Se caracteriza por células redondas, ovaladas o poligonales muy grandes con núcleo pleomórfico y raro similar a las células Reed-Sternberg. Estas células crecen de manera cohesiva y muestran un patrón de crecimiento sinusoidal (Swerdlow et al., 2008)
		

En México el LDCBG es el subtipo más común de los linfomas no Hodgkin, representa aproximadamente el 57% de los casos reportados. La edad promedio de los pacientes mexicanos es alrededor de 50 años, entre 10 y 20 años más jóvenes que los pacientes de países desarrollados, el 58% de los pacientes

corresponde a hombres y el 42% a mujeres (Caimi et al, 2016, Swerdlow et al., 2008; Romero Guadarrama et al., 2006).

Los tipos morfológicos de LNH más comunes en México son el linfoma centroblástico polimorfo, centroblástico monomorfo, anaplásico inmunoblásticos y linfomas B ricos en células T. El 40% de los linfomas LDCBG son extraganglionares y los sitios afectados son: anillo de Waldeyer (amígdalas palatinas), región centrofacial, sistema nervioso central, glándula salival, piel, tiroides y en glándulas mamarias (Romero-Guadarrama et al, 2006).

El tratamiento estándar para los pacientes con LDCBG es una combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona, mejor conocida como CHOP. Sin embargo, este tratamiento tiene una respuesta completa únicamente en un 40% de los pacientes mayores y sólo otorga un periodo de 3 años libres de enfermedad (Verdnock, et.al., 1995). Actualmente, se utiliza una combinación de CHOP con rituximab (R-CHOP), un anticuerpo IgG monoclonal anti-CD20, que ha demostrado un mejor pronóstico que el tratamiento únicamente con CHOP (Coiffier et. al. 2002, Coiffier et. al., 2010). A pesar de estos resultados se ha reportado que hay pacientes que incluso con este esquema de tratamiento son refractarios y otros que al terminar el esquema del abordaje reinciden (Récher et. al. 2011). En casos donde la enfermedad es refractaria al tratamiento resulta en una supervivencia de 3 años libre de progresión de la enfermedad únicamente del 23%, aún incluso con altas dosis y trasplante autólogo de células troncales (Gisselbrecht et. al. 2010).

Linfoma cutáneo de células T

Los linfomas cutáneos son un grupo heterogéneo de linfomas no Hodgkin definidos por la presencia de linfomas extranodales en la piel (Devata et al, 2016; Damsky et al, 2016). Dentro de los linfomas no Hodgkin extranodales, la piel es el segundo sitio más común después del tracto gastrointestinal (Siles et al, 2007). Cerca de tres cuartas partes de todos los casos son de origen linfocitario T CD4+, siendo el subtipo más prevalente la micosis fungoide (MF) (Devata et al, 2016; Shipman et al, 2016). Otra variante de linfoma cutáneo de células T (LCCT) es el síndrome de Sézary (SS), y es la causante del 3% de los casos de linfoma (Saulite et al, 2016). La MF tiene una incidencia del 0.29% por cada 100,000 habitantes, predominio masculino a razón 2:1 contra mujeres y de aparición preferencial en jóvenes (Juárez et al, 2005). En conjunto, ambas enfermedades representan el 50% de todos los casos de LCCT (Devata et al, 2016).

Dentro de la clasificación otorgada por la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC), la MF se distingue en las variedades clínico-patológicas conocidas como poiquilodermia vascular atrófica, MF granulomatosa, hipopigmentada, centrofolicular, siringotrópica, d'emblee, de palmas y plantas, variante ictiosiforme y enfermedad de Woringer-Kolopp, y dependiendo de la variedad de MF la sobrevida a 5 años es estimada entre 75 a 100%. Por su parte, el SS es una variante muy agresiva y su sobrevida se estima en 11% a 5 años (Juárez et al, 2005).

Dentro de los LCCT se han reportado múltiples factores de riesgo que es importante considerar. Como factores genéticos, ya que es común identificar anomalías genómicas de origen heterogéneas, como la presencia del haplotipo HLA-DR5, daño en el gen del receptor de linfocito T *TCR*, y múltiples aberraciones en cromosomas 3, 6, 8, 9, 11, 13 y 17. También se han sugerido ciertas infecciones previas, como las causadas por el virus linfotrópico de células T-1 (HTLV-1) y por el virus de Epstein Barr, pero los datos al respecto son controversiales. La respuesta inmunológica también se ha asociado, al sospechase una previa desviación de respuesta tipo Th1 hacia una Th2, la cual es vinculada con la producción de IgE, IL-5 e IL-10, y con la ausencia de IL-2 y de IFN- γ , interesantemente todas estas particulares son apreciables de manera importante en Síndrome de Sézary (Juárez et al, 2005).

Durante mucho tiempo se ha considerado que la MF y el SS eran enfermedades que seguían un origen común; sin embargo, un trabajo reciente reportó que ambas enfermedades pueden surgir a partir de diferentes poblaciones de linfocitos T (Damsky et al, 2016). Las clonas neoplásicas en MF poseen los marcadores de superficie de linfocitos T CD4+ cutáneos de memoria, una población no recirculante de linfocitos T con función efectora marcada que suele residir en la unión dermoepidérmica (Damsky et al, 2016). En contraste, las clonas neoplásicas en SS poseen marcadores de linfocitos T CD4+ de memoria centrales, que son una población migratoria de memoria central recirculante entre la piel, linfonodos, sangre y órganos viscerales (Damsky et al, 2016; Saulite et al, 2016).

La MF es una enfermedad de difícil tratamiento, es incurable y suele ser refractaria (Shipman et al, 2016). Los pacientes en estadio temprano cursan con enfermedad limitada a la piel, con parches pequeños en áreas protegidas del sol y placas cutáneas discretas y eritematosas; la enfermedad progresa con lentitud durante los siguientes 10-15 años (Shipman et al, 2016; Juárez et al, 2005). El estadio avanzado es reconocido por la presencia de infiltración sanguínea, eritroderma, linfonodos cutáneos y daño visceral, lo cual se relaciona con un pronóstico oscuro (Damsky et al, 2016; Shipman et al, 2016; Juárez et al, 2005).

El SS es una variante leucémica agresiva de LCCT, que típicamente surge *de novo* y se caracteriza por eritroderma, prurito extremo, linfonodos y la presencia de células de Sézary en sangre periférica (Damsky et al, 2016; Saulite et al, 2016).

Tanto la MF como el SS poseen manifestaciones tempranas parches eritematosos discretos y placas cutáneas. Al progresar ambas enfermedades, las células de LCCT proliferan localmente para generar tumores nodulares (Damsky et al, 2016). Eventualmente, las lesiones se esparcen a regiones cutáneas antes no involucradas (Figura 2), generando eritroderma cutáneo completo, y en enfermedad avanzada los linfocitos T CD4+ malignos se esparcen por la sangre, linfonodos y órganos viscerales (Damsky et al, 2016). Además, en las dos enfermedades existe una reducción en la inmunidad mediada por células Th1 y Th17, lo que se relaciona con incremento en la producción de citocinas Th2, como IL-4 e IL-5, así como quimiocinas de unión a CCR4 -receptor de CCL17 y CCL22 que se expresa de manera prioritaria en linfocitos T CD4+ polarizados hacia Th2.

Estudios preliminares demuestran un incremento en colonización cutánea por *Staphylococcus aureus* en estos pacientes (Saulite et al, 2016).

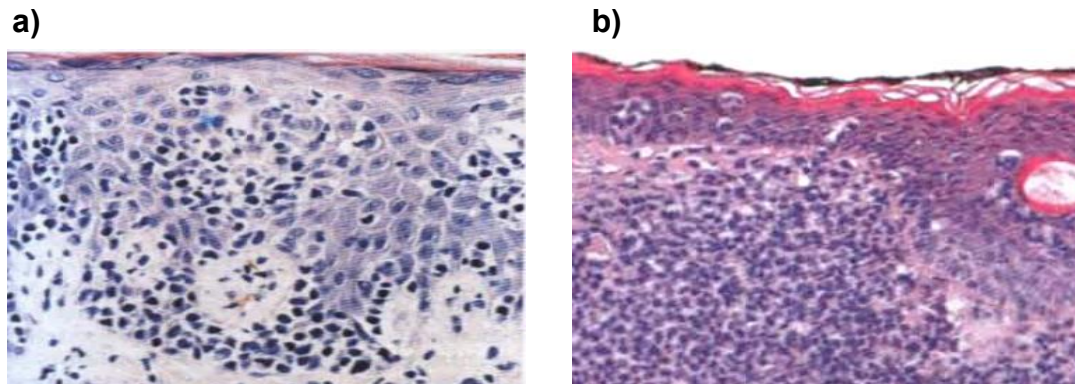


Figura 2. Cortes histológicos de micosis fungoide (MF) y síndrome de Sézary (SS). a) Corte histológico de la placa de un paciente con células de MF infiltradas en la piel. b) Corte histológico de infiltrado cutáneo epidermotrópico de linfocitos cerebriformes característicos de SS. (Swerdlow, 2008)

El diagnóstico de MF y SS requiere múltiples datos, incluyendo la presentación clínica, biopsias cutáneas, estudios de clonalidad de linfocitos T, citometría de flujo e incluso estudios de imagen (Damsky et al, 2016). Enfermedades como la dermatitis atópica pueden ser un reto como potenciales diagnósticos diferenciales, particularmente con SS en adultos que presenten dermatitis eritrodérmica, aunque en SS suele ser común la presencia de hiperqueratosis palmoplantar que permite una rápida distinción clínica (Saulite et al, 2016). Por lo anterior, se recomienda la realización de estudios adicionales además del enfoque clínico.

En el estudio histopatológico de MF se muestra infiltrado neoplásico de linfocitos T CD4+ de tamaño pequeño a intermedio, los cuales poseen núcleo hiper cromático. Estas células muestran epidermotropismo y ocasionalmente forman los

patognomónicos abscesos de Pautrier, que representan cúmulos de células LCCT alrededor de células de Langerhans en epidermis (Damsky et al, 2016). Por otra parte, las células de Sézary son células leucémicas con núcleo cerebriforme característico (Damsky et al, 2016).

El tratamiento de los LCCT suele ser empírico, debido a que existen pocos biomarcadores que guíen el diagnóstico, estadio y pronóstico, por lo que el abordaje es complicado (Damsky et al, 2016). Alemtuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el marcador pan-T y B CD52, ha mostrado utilidad en SS y en MF implicados en leucemia ya que genera depresión de linfocitos circulantes y supresión de respuesta inmune. Sin embargo, tiene como efectos adversos la aparición de múltiples infecciones oportunistas (Saulite et al, 2016). Los anticuerpos pembrolizumab y nivolumab se dirigen hacia la molécula PD-1, asociada a la inhibición de la actividad linfocitaria, y actualmente se encuentra un estudio en fase 2 para el tratamiento de MF y SS refractarios (Saulite et al, 2016). Mogamulizumab es otro anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce a CCR4, está actualmente en estudio clínico fase 3 para el tratamiento de SS (Saulite et al, 2016). Por otro lado, el anticuerpo monoclonal ipilimumab dirigido contra el regulador negativo de CD28 en linfocitos T, CTLA-4, que se sobreexpresa en SS e diferenciación de estas células hacia linfocitos T reguladores (Treg), pero a la fecha no existen estudios que valoren su eficacia en SS (Saulite et al, 2016).

Epigenética

La epigenética se define como las modificaciones que ocurren sobre el DNA pero que no afectan su secuencia y cuyo efecto recae sobre los patrones de expresión génica. Estas modificaciones epigenéticas incluyen ganancia o pérdida de metilación de DNA, así como patrones de modificación sobre las histonas. El DNA y las histonas se organizan en nucleosomas, unidades estructurales esenciales para organizar la cromatina. El estado de compactación de la cromatina regula la accesibilidad al DNA y por lo tanto tiene una función crucial al establecer y propagar diversos patrones de expresión génica e inestabilidad genómica, que puede resultar en un fenotipo maligno (Iacobuzio-Donahue, 2009).

Las histonas forman octámeros en forma de disco denominados nucleosomas y son las unidades estructurales esenciales para organizar la cromatina. Este octámero está formado por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas son proteínas de bajo peso molecular, aproximadamente 11-12 Kd. y presentan alto contenido de lisinas y argininas (aminoácidos básicos). Con las cargas positivas de las cadenas laterales de estos restos, las histonas (que son extremadamente básicas) se unen a los grupos fosfato del ADN (cargados negativamente) haciendo una estructura más estable. Las histonas son modificadas por metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, citrulación, ubiquitinación, sumolación y ADP-ribosilaciones (Iacobuzio-Donahue, 2016, Ruthenburg et al, 2007).

Una de las modificaciones de histonas más estudiada es la acetilación y desacetilación que está mediada por enzimas llamadas acetiltransferasas de

histonas (HATs) y desacetilasas de histonas (HDACs), respectivamente. La acetilación de histonas en los residuos de lisina por las HATs, provoca la neutralización de las cargas positivas lo cual disminuye su afinidad con el DNA por lo que se pierde su interacción. En consecuencia, la cromatina queda en un estado menos compacto permitiendo la unión de factores de transcripción al DNA y por lo tanto la transcripción de genes. De manera contraria, la desacetilación de histonas mediada por HDACs genera una cromatina más compacta lo que impide la interacción de la maquinaria de transcripción (Iacobuzio-Donahue, 2009; Rice et al., 2001).

Por otro lado, la metilación de histonas, también está asociada a la activación o represión de la expresión genética dependiendo del residuo metilado. Diversos estudios han demostrado que los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 son los más comúnmente metilados y cada metilación está asociada con la activación o represión de la transcripción, por ejemplo: la metilación de la lisina 4 de la H3 (H3K4), H3K36 o H3K79 son marcas activas debido a que la metilación en estos residuos específicamente induce la expresión genética y con ello una cromatina activa, contrario a estas, la metilación de H3K9, H3K27 o H3K20 induce un silenciamiento de genes y una cromatina inactiva (Iacobuzio-Donahue, 2009). Una característica de la metilación de histonas, es que puede estar presente más de un grupo metilo en la misma lisina, es decir, las lisinas se pueden monometilar, dimetilar o trimetilar.

Diversos estudios han reportado que el complejo Polycomb 2 es el encargado de llevar a cabo la adición de grupos metilo sobre H3K27 lo que resulta en una

represión transcripcional. La adición de tres grupos metilo (trimetilación) a H3K27 está asociada a la represión de genes *HOX* debido al reclutamiento del complejo Polycomb 1 cuya función es regular la compactación de la cromatina y la represión de la transcripción (Conway et al., 2015; Chase et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que estos procesos epigenéticos están asociados con el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, un aumento en la trimetilación de la H3K27 se ha asociado con la represión de genes supresores como p16, p19 y p15 en diferentes tipos de cáncer (Margueron et al., 2011). Sin embargo, cabe mencionar que estas modificaciones son reversibles.

Con base en estos antecedentes ha surgido la terapia epigenética como una nueva herramienta para combatir el cáncer y como una alternativa para encontrar fármacos que traten de revertir estos procesos epigenéticos.

EZH2 y su papel en cáncer

EZH2 es una metiltransferasa de histonas (por las siglas en inglés de “Enhancer of Zeste”) que forma parte del complejo represor Polycomb 2 (PRC2) junto con las proteínas EED, SUZ2 y RbAp46/48 (por las siglas en inglés “Embryonic Ectoderm development”, Supresor of Zeste”, “Retinoblastoma binding protein” respectivamente, Figura 3A) (Chase et al, 2011). Diversos estudios han demostrado que PRC2 regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo embrionario, diferenciación celular, silenciamiento de genes homeóticos e inactivación del cromosoma X (Cao et al, 2004). También se ha demostrado que la

metilación de H3K27 es realizada por la proteína EZH2 a través de su dominio SET, el cual le proporciona la función de N-metiltransferasa de histonas y está altamente conservado en metiltransferasas de histonas (HMTs) (Figura 3B) (Yoo et al., 2011).

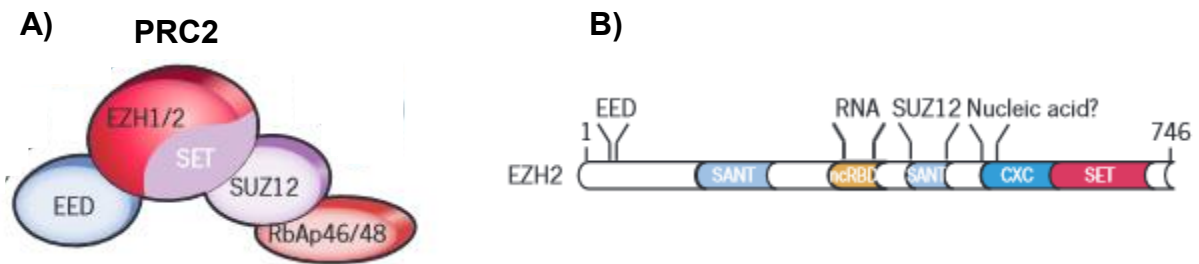


Figura 3. A. Subunidades que conforman el complejo PRC2: EZH2, EED, SUZ12 y RbAp46/48. B Estructura de la proteína EZH2 y sus dominios: SANT, dominio de interacción con histonas; ncRBD, dominio de unión de RNAs no codificantes; CXC, dominio de unión a DNA y SET, dominio catalítico (Modificado de Margueron et al. 2011).

Sin embargo, diversos estudios han reportado alteraciones de EZH2 en diferentes tipos de cáncer. Un estudio demostró una sobreexpresión de EZH2 en pacientes con cáncer de mama invasivo en comparación con pacientes con hiperplasia atípica lo que sugiere a EZH2 podría ser un buen indicador de agresividad e invasión en cáncer (Kleer et al., 2003). Otro estudio también demostró la sobreexpresión de EZH2 a nivel RNA mensajero y proteína en cáncer de próstata metastásico y dichos niveles correlacionan con un mal pronóstico de la enfermedad (Varambally et al., 2002). Interesantemente, también se ha reportado

la sobreexpresión de EZH2 en cáncer de vejiga, gástrico, carcinoma hepatocelular y pulmón (Chase et al., 2011).

Interesantemente, se ha reportado que el 22% de los LDCBG presentan una mutación en EZH2 asociada al aumento de la trimetilación de H3K27. (McCabe et al, 2012). Esta mutación cambia la alanina (Ala, A) del residuo 677 por una glicina (Glicina, G) (A677G) y recae justamente en el dominio SET de EZH2 (McCabe et al, 2012). Esta mutación, ha demostrado que EZH2 adquiere una ganancia de función debido a que trimetila la H3K27 al mismo tiempo que disminuye la monometilación (figura 4) (McCabe et al, 2012).

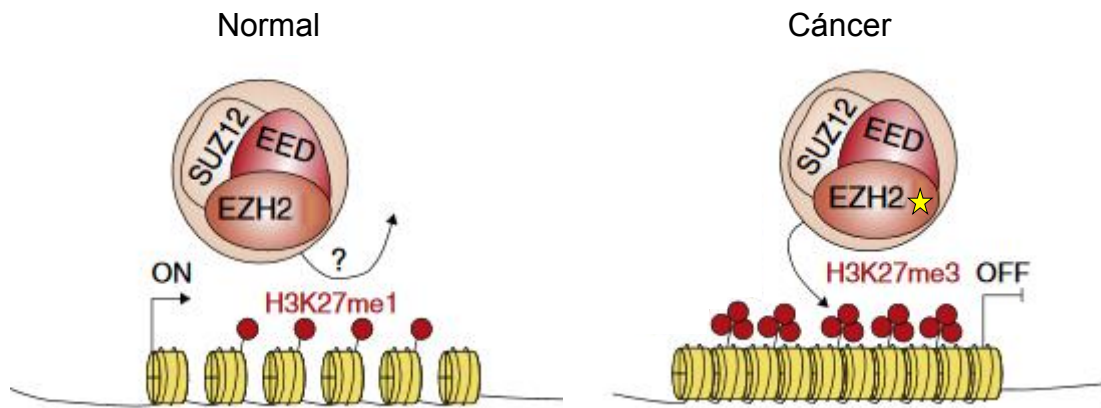


Figura 4. Función de EZH2 en células normales y células tumorales. En estado normal PRC2 y EZH2 monometila la H3K27 mientras que en una célula tumoral la mutación A677G, induce una ganancia de función de de EZH2 que provoca la trimetilación de H3K27 y con ello la compactación de la cromatina (Modificado de Conway et al, 2015).

Terapia epigenética dirigida a EZH2

Debido a que los eventos epigenéticos juegan un papel importante en cáncer y que una de la característica más importante es que son potencialmente reversibles, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar nuevas terapias como la “terapia epigenética” cuyo blanco sea una proteína que participe en algún mecanismo epigenético y así poder actuar como terapia adyuvante para el tratamiento del cáncer.

Con base en esto, uno de los primeros inhibidores de EZH2 que se descubrió fue 3-Deazaneplanocin A (DZNep), un fármaco inhibidor de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa, que resulta en la acumulación de S-adenosilhomocisteína y con ello induce la inhibición de metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina (Glazer et al., 1986). Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con DZNep disminuye los niveles de la proteína EZH2, así como los niveles de metilación de H3K27 (Tan et al., 2007). También se ha observado que el tratamiento con DZNep induce de manera específica muerte celular por apoptosis en células tumorales de manera específica al reactivar la expresión de genes transcripcionalmente reprimidos como *FBXO32*, un gen que codifica para la proteína del mismo nombre y participa en la regulación de apoptosis en células de carcinoma mamario (Tan et al., 2007). Sin embargo, a pesar de la efectividad y alta selectividad del DZNep su vida media es muy corta en plasma y la inhibición de la metilación de histonas es inespecífica, además también ha demostrado toxicidad en modelos animales, por lo que su uso en humanos es muy poco probable (Miranda, 2009).

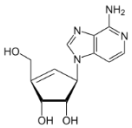
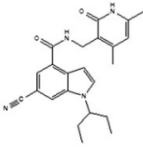
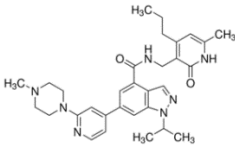
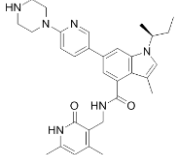
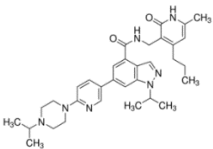
Actualmente se han ido desarrollando otros inhibidores de EZH2 (Tabla 3). Por ejemplo, EPZ005687 es un inhibidor de EZH2 que presenta una selectividad quinientas veces mayor que para otras metiltransferasas (Knutson et al., 2012). Otro inhibidor que ha sido estudiado es EPZ003687, el cual ha demostrado una disminución dosis-dependiente de los niveles de trimetilación de H3K27 en linfomas con EZH2 normal y con las mutaciones Y641 o A677 en líneas de cáncer de mama y próstata. GSK126, es otro inhibidor de EZH2 el cual presenta mayor selectividad hacia EZH2 que EPZ003687 e inhibe el crecimiento de linfomas con mutaciones de ganancia de función en EZH2 (Verma et al., 2012; McCabe et al., 2012). EI1 es otro inhibidor de EZH2 normal y mutada, presenta una selectividad diez mil veces mayor hacia EZH2 que para otras metiltransferasas y altera los niveles de H3K27me2 y H3K27me3 sin afectar la cantidad de proteína total de EZH2, además inhibe el crecimiento celular, causa arresto del ciclo celular y apoptosis en células con mutaciones en EZH2 (Qi et al., 2012). UNC1999, es otro inhibidor de EZH2, que puede administrarse vía oral, sin embargo, los resultados como inhibidor no son tan buenos como con los inhibidores anteriores (Konze et al., 2013). GSK343, también es un inhibidor de EZH2 el cual actúa como inhibidor competitivo por S-adenosilmetionina (SAM) y presenta una selectividad hacia EZH2 mil veces mayor que para otras metiltransferasas e inhibe la proliferación celular en cáncer de carcinoma mamario y próstata (Verma et al., 2012).

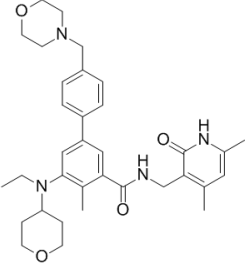
Finalmente, uno de los inhibidores de EZH2 más reciente es EPZ-6438 el cual inhibe la trimetilación de H3K27 de manera dosis-dependiente en células de linfoma con EZH2 normal o mutado (Knutson et al., 2014). Un estudio reciente

demonstró que el tratamiento con EPZ-6438 disminuye la trimetilación de H3K27 y el crecimiento tumoral en un modelo murino (Knutson et al., 2014). Sin embargo, este fármaco aún se encuentra en la fase I-II de los ensayos preclínicos (datos no publicados <http://www.epizyme.com/wp-content/uploads/2014/11/Ribrag-ENA-FINAL.pdf>).

Por otro lado, también se ha reportado un péptido llamado “stabilized alpha-helix of EZH2” (SAH-EZH2) el cual inhiben la función enzimática de EZH2, y es derivado del dominio de EZH2 que interacciona con EED para formar el complejo PRC2 (Kim et al., 2013). SAH-EZH2 impide la unión EZH2-EED, y reduce los niveles de la proteína EZH2 e inhibe de manera dosis dependiente la trimetilación de H3K27 en células de linfoma con mutaciones en EZH2. Y aún está en etapas preclínicas.

Tabla 3. Inhibidores de EZH2, mecanismo de acción, selectividad y fase de estudio. (Modificado de Kim et al., 2016)

Compuesto	Mecanismo	Selectividad	Fase de estudio
<p>DZNep</p> 	Inhibidor de PRC2 por competencia con SAM	-	Preclínica
<p>EI1</p> 	Inhibidor de PRC2 por competencia con SAM	>10,000 veces mayor que a otras HMTs	Preclínica
<p>EPZ003687</p>	Inhibidor de PRC2 por competencia con SAM	>500 veces mayor que a otras HMTs	Preclínica
<p>GSK343</p> 	Inhibidor de PRC2 por competencia con SAM	1,000 veces mayor que a otras HMTs	Preclínica
<p>GSK126</p> 	Inhibidor de PRC2 por competencia con SAM	>1,000 veces mayor que a otras 20 HMTs	Fase 1
<p>UNC1999</p> 	Inhibidor de PRC2 por competencia con SAM	10,000 veces mayor que a otras HMTs	Preclínica

<p>EPZ-6438</p> 	<p>Inhibidor de PRC2 por competencia con SAM</p>	<p>>4,500 veces mayor que a otras 14 HMTs</p>	<p>Fase I-II</p>
<p>Stabilized α-helix of EZH2 peptide (SAH-EZH2)</p>	<p>Péptido que imita el α-hélice de la unión EZH2-EED</p>	<p>-</p>	<p>Preclínica</p>

Reposicionamiento terapéutico

Actualmente el cáncer representa uno de los principales problemas en el sector salud a nivel mundial y se estima que para el 2020 habrá 15 millones de nuevos casos en todo el mundo (Mignona et al, 2004). Con base en lo anterior muchos grupos científicos han adoptado diversas estrategias para combatir el cáncer. Una de las nuevas estrategias es identificar una molécula blanco y generar un fármaco dirigido cuya función sea inhibir o contrarrestar la función de dicha molécula, sin embargo, de manera general éste método no ha sido el más efectivo debido a que algunas “terapias blanco” sólo logran controlar los síntomas y/o aumentar la supervivencia de los pacientes y otras no pasan los ensayos clínicos debido a su toxicidad (Dueñas-González et al, 2008). A pesar del fracaso de esta estrategia, ésta se sigue llevando a cabo debido a las grandes ganancias económicas que genera a las farmacéuticas.

Por lo que una nueva estrategia que se ha implementado para el desarrollo de nuevos fármacos es el “reposicionamiento farmacéutico” el cual tiene como objetivo utilizar medicamentos indicados en otros padecimientos, que podrían tener una actividad como agentes antitumorales (Ashburn et al, 2004; Dueñas-González, 2008). Una de las principales ventajas del reposicionamiento farmacéutico es que los estudios de farmacocinética, farmacodinamia y los perfiles de toxicidad son bien conocidos y, por lo tanto, es más probable que estos fármacos aprueben la fase clínica II y III, lo que reduce de gran manera el tiempo invertido en el desarrollo de las drogas (Ashburn et al, 2004). Finalmente, otra de las ventajas de esta nueva estrategia es reducir los costos, lo que hará más accesible la terapia a los pacientes con cáncer y podría generar un gran impacto en la reducción de la mortalidad por cáncer (Dueñas-González et al, 2008).

Hoy en día existen varios fármacos obtenidos mediante el reposicionamiento farmacéutico, un ejemplo es el Viagra, cuyo fármaco era indicado contra la angina de pecho, pero su efecto secundario fue provocar erecciones prolongadas (Langtry et al, 1999). Otro ejemplo es el Finasteride (Proscar; Merck), un inhibidor de la 5- α -reductasa que originalmente, a partir de 1992, era indicado para la hiperplasia prostática benigna; sin embargo, en 1997 fue aprobado para el tratamiento de la pérdida de cabello (Kauffman et al, 1998). Un ejemplo más es el Celecoxib (Celebrex; Pfizer), un inhibidor de la ciclooxigenasa-2, indicado para la osteoartritis y artritis reumatoide, y diversos estudios han demostrado que reduce

el tamaño y número de adenomas en pacientes con cáncer colorectal con poliposis adenomatosa colorectal (Steinbach et al, 2000).

Un trabajo realizado en nuestro laboratorio demostró que pacientes con leucemia mieloide crónica resistentes a imatinib (tratamiento contra leucemia mieloide crónica) tratados con la combinación de Hidralazina y Valproato de magnesio (Transkrip), originalmente indicados como antihipertensivo y antiepiléptico respectivamente, funcionan como inhibidores de la metilación del DNA y de la deacetilación de histonas respectivamente mejorando el pronóstico de los pacientes de manera significativa (Cervera et al., 2012).

Antecedentes Directos

Un estudio *in silico* para tratar de encontrar moléculas con homología estructural al DZNep realizado en nuestro laboratorio demostró que el ribavirín, presenta un 70% de similitud estructural con la molécula de DZNep.

El “ribavirín” (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), es un análogo de nucleósido y un antiviral (Sidwell et al., 1979) que se indica principalmente para el tratamiento de hepatitis C. Un trabajo realizado en nuestro laboratorio demostró que el tratamiento con ribavirín disminuye la expresión de EZH2, así como su actividad metiltransferasa y los niveles de H3K27me3 en células de carcinoma mamario MCF-7. En este trabajo también se observó que el tratamiento con ribavirín inhibe el crecimiento celular de la línea de cáncer de próstata PC-3 y disminuye los niveles de las proteínas EZH2, eIF4E e IMPDH1 y 2 (De la Cruz-Hernández, et. al., 2014).

Como se puede observar en la figura 5A se muestran la estructura en dos dimensiones de DZNep y ribavirín así como el alineamiento en tercera dimensión de ambas moléculas donde se demuestra las sobreposición de las estructuras de ambos fármacos.

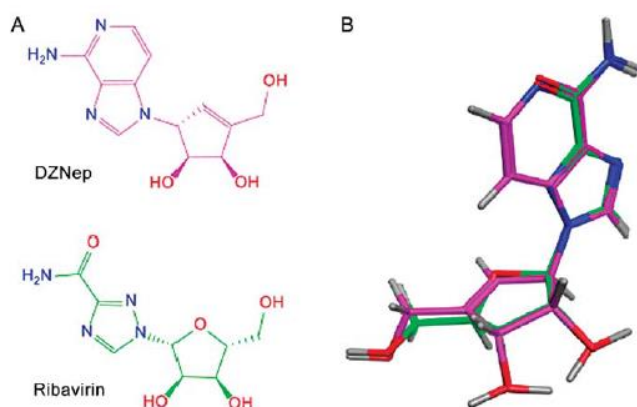


Figura 5. Ribavirín y DZNep tienen una estructura molecular muy similar. (A) Estructura del DZNep y ribavirín en dos dimensiones. (B) Alineamiento en tres dimensiones de las estructuras moleculares del DZNep y ribavirín.

Con base en estos antecedentes, este trabajo propone evaluar al ribavirín como un posible candidato para el reposicionamiento farmacéutico en el tratamiento del linfoma no Hodgkin.

Justificación

El tratamiento con DZNep ha demostrado tener un efecto como inductor de apoptosis en células de linfoma no Hodgkin, carcinoma mamario, próstata, vejiga y pulmón. Por otro lado, un trabajo reciente demostró que el ribavirín tiene homología estructural al DZNep y un efecto antiproliferativo e inhibidor de EZH2 en líneas celulares de carcinoma mamario y próstata. Por lo que nos parece de gran interés analizar el efecto del ribavirín como posible inhibidor de la proliferación a través de la inhibición de EZH2 en células de linfoma no Hodgkin. Lo cual permitiría proponer al ribavirín como un candidato para el reposicionamiento farmacéutico en el tratamiento de pacientes con linfomas no Hodgkin.

Hipótesis

Ribavirín inhibe la proliferación de células de linfoma No-Hodgkin a través de la inhibición de EZH2.

Objetivo general

Evaluar el efecto de ribavirín en líneas celulares de linfoma no Hodgkin.

Objetivos particulares

1. Analizar el efecto del tratamiento con ribavirín sobre la viabilidad de las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin.
2. Evaluar el efecto del ribavirín sobre la capacidad clonogénica de las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin.
3. Evaluar los niveles de la proteína EZH2 en las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin.
4. Determinar los niveles de la marca de represión H3K27me3 en las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin.

Metodología

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares derivadas de linfoma no Hodgkin con diferentes características fenotípicas (tabla 4).

Tabla 4. Características fenotípicas de las líneas celulares Pfeiffer, Toledo y Hut78.

	Pfeiffer	Toledo	Hut78
Linfoma	LDCGB (linfoma difuso de células B grandes)	LDCGB (linfoma difuso de células B grandes)	LCCT (Linfoma cutáneo de células T)
Fenotipo de EZH2	A677G	Silvestre	Silvestre

Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 pH 7.4 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una solución comercial de antibióticos compuesta por 100 U/mL de penicilina y 100 µL de estreptomina (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

Fármacos

3-Deazaneplanocin A (DZNep) Calbiochem #Cat: 120964-45-6.

Ribavirín – Sigma #Cat: 36791-04-5.

Ensayos de viabilidad

Se cultivaron 2×10^5 células en 5mL de medio RPMI-1640 contenidos en una botella de cultivo celular de 25cm² con una atmosfera húmeda de 5% de CO₂ y posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de ribavirín durante cinco días. Como control positivo se utilizó 3-Deazaneplanocin A (DZNep) a 0.1 µM. Se realizaron cambios con medio fresco y fármaco nuevo a las 48 y 96 h de tratamiento. Al finalizar los tratamientos se evaluó la viabilidad celular por el método de exclusión con azul de tripano en un contador automatizado TC10™ (Bio-rad). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayos clonogénicos

Después de los tratamientos se obtuvo un botón celular mediante centrifugación y se sembraron 2,000 células en cajas de 25 cm² con 3 mL de medio RPMI-1640 y se agregaron 2 mL de medio fresco cada 72 h. En el octavo día se evaluó la viabilidad celular por el método de exclusión con azul de tripano en un contador automático y con estos valores se calculó la eficiencia de plaqueo y la capacidad clonogénica utilizando las siguientes fórmulas:

$$Eficiencia\ de\ plaqueo = \left(\frac{Promedio\ de\ no.de\ células\ vivas}{no.de\ células\ sembradas} \right)$$

$$Capacidad\ clonogénica = \left(\frac{Eficiencia\ de\ plaqueo\ de\ la\ muestra}{Eficiencia\ de\ plaqueo\ del\ control} \right) * 100$$

Extracción de proteínas

Después de 24, 48 y 120 horas de tratamiento con ribavirín las células se centrifugaron a 120g y a continuación, los botones celulares se resuspendieron en 100µl de buffer de lisis (1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, NaCl₂, Tris 50mM) y se adicionó un inhibidor de proteasas PMSF (1mM) y 1X de cocktail de inhibidor de proteasas (# Cat. P8340, Sigma-Aldrich). La concentración de proteínas de cada una de las muestras se ajustó mediante la normalización de geles de acrilamida.

Extracción de histonas

Después de 24, 48 y 120 horas de tratamiento con ribavirín se obtuvieron los botones celulares por decantación y posteriormente se resuspendieron las muestras en 500 µL de buffer de lisis NIB [1% de NP-40 en IB (Tris-HCl 10 mM pH7.4, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 3mM y 1x de inhibidor de proteasas) y se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C por 6 minutos para la obtención de núcleos. Posteriormente se retiró el sobrenadante y las histonas fueron obtenidas del paquete nuclear con 200 µl de H₂SO₄ 0.2 M a 0°C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 16 minutos y se recuperó el sobrenadante con las histonas extraídas. Finalmente, las histonas son precipitadas con 80% de acetona fría y 35 µL urea 4M.

Western Blot

Se tomaron 30 µg de proteínas por muestra y se mezclaron en un tubo con buffer desnaturizante (20 µL de Tris-Cl 0.5 M pH 6.8, 20 µL de glicerol, 40 µL de SDS

10%, 20 μ L de azul de bromofenol al 1% y 10 μ L de β -mercaptoetanol) en una proporción 1:1 y se colocaron en ebullición durante cinco minutos.

Las muestras se cargaron en un gel desnaturizante al 15% de acrilamida como se describe en la siguiente tabla 2.

Tabla 5. SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

	Gel separador 15% pH 8.8	Gel de carga 4% pH 6.8
Agua	2.8 mL	3.05 MI
	3 mL de tris 1.5 M pH 8.8	1.25 mL de tris 0.5 M pH 6.8
SDS 10%	120 μ L	50 μ L
Acrilamida 30%	6 mL	.6 mL
APS 10%	120 μ L	25 μ L
TEMED	12 μ L	5 μ L

Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, BioRad con un poro de 0.22 μ m) durante toda la noche a 25 volts en agitación constante a 4°C. Después de este periodo la membrana se incubó en una solución de bloqueo [leche baja en grasas al 5% en TTBS (Tris 0.2 M pH 7.5, NaCl 0.5M) -tween al 0.05%] por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario contra EZH2 (anti-EZH2 #Cat. 36300, Invitrogen, E.U.), H3K27me3 (anti-H3K27me3 #Cat. 07-449 Millipore, E.U.) y como controles de carga anti-actina (#Cat sc-1615, Santa Cruz Biotechnology, E.U.) y anti-H3 total (anti-H3 #Cat 06-755 Millipore, E.U.) a una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche en agitación. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados de 15 minutos

con TTBS y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano diluido 1:1000 en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas fueron visualizadas mediante un sustrato quimioluminiscente (Bio-rad) y placas radiográficas (GE Healthcare) en oscuridad.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianzas (ANOVA) y las diferencias estadísticas entre grupos se establecieron por la prueba de Dunnett utilizando el programa computacional GraphPad Prism versión 5. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

Ribavirín inhibe la proliferación de células de linfoma no Hodgkin

En un trabajo reciente se demostró la que el ribavirín inhibe la viabilidad de las células MCF7 de carcinoma mamario y PC3 de cáncer de próstata (De la Cruz-Hernández et al, 2015). Sin embargo, su efecto en linfomas no Hodgkin no ha sido dilucidado.

Con base en estos antecedentes se analizó el efecto del ribavirín en las líneas celulares de linfoma no Hodgkin Hut78, Pfeiffer y Toledo mediante ensayos de viabilidad con diferentes dosis de ribavirín (10, 20 y 50 μM) en tres tiempos diferentes (24, 48 y 120 horas).

Como se puede observar en la figura 6 el tratamiento con ribavirín disminuye de forma significativa la viabilidad celular a 120 horas. En las células Hut78 el tratamiento con ribavirín disminuye el 91.07%, en Pfeiffer 61.46% y en Toledo 73.75%. Interesantemente el tratamiento con el control positivo (DZNep) no tuvo mayor efecto en Hut78.

Estos resultados demuestran que las líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin son sensibles al tratamiento con ribavirín.

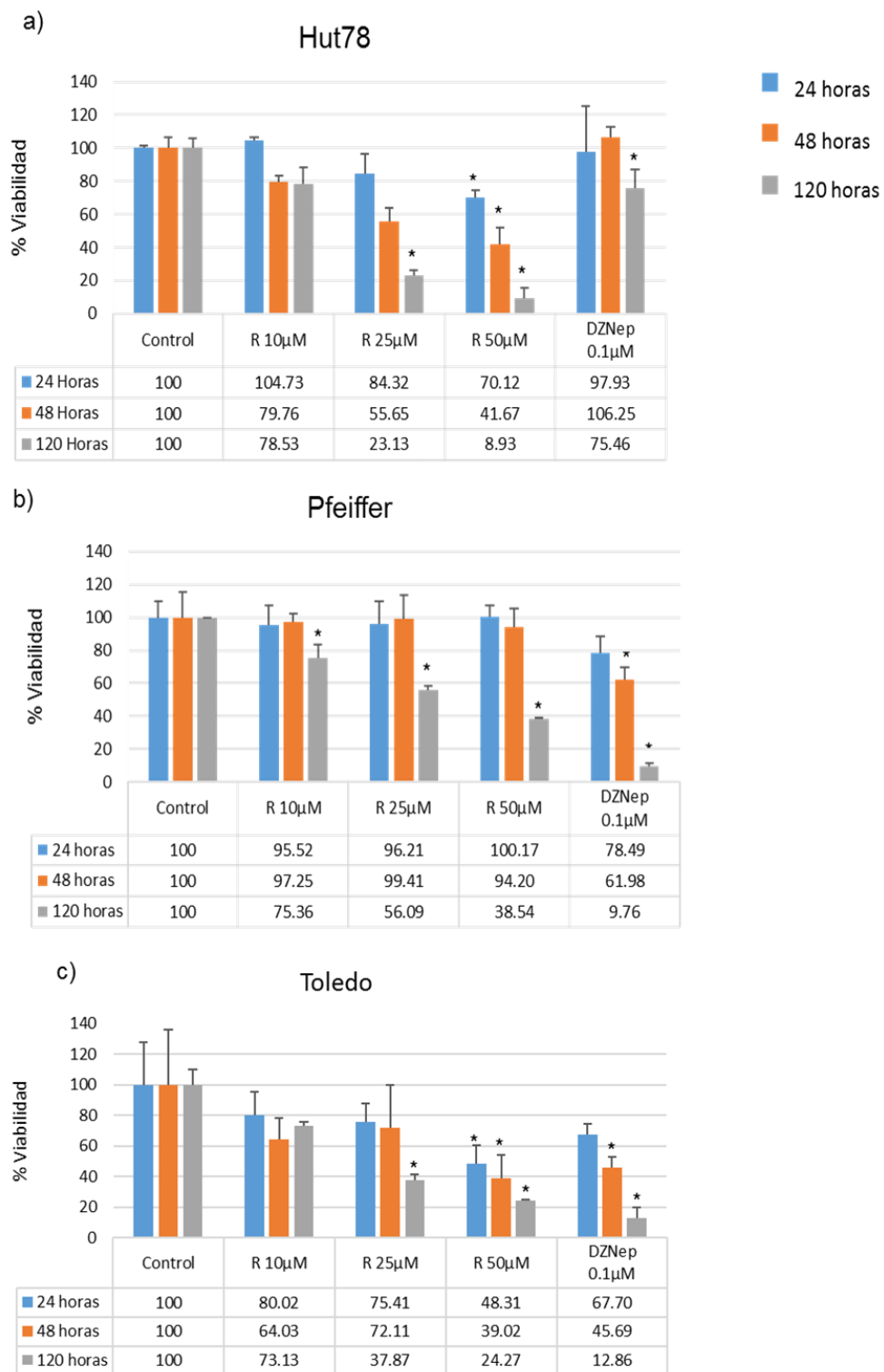


Figura 6. Efecto del ribavirín en la viabilidad celular de células de linfoma no Hodgkin Hut78, Pfeiffer y Toledo. Las células Hut78, Pfeiffer y Toledo se trataron con 10, 25 y 50 μ M de ribavirín durante 24, 48 y 120 horas. Al término de los tratamientos se evaluó la viabilidad por el método de exclusión con azul de tripano. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. R=ribavirín. * Diferencias significativas con respecto al control con una $p < 0.05$.

El tratamiento con ribavirín inhibe la capacidad clonogénica de células de linfoma no Hodgkin

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con ribavirín disminuye la capacidad clonogénica de las tres líneas celulares de linfoma no Hodgkin. Sin embargo, como se puede observar en la figura 7, los tratamientos con ribavirín comienzan a disminuir la capacidad clonogénica a partir de, 10 μ M y con mayor efecto a 50 μ M en células Hut78 y Pfeiffer, 46.26% y 10.88%, respectivamente, con respecto al control. Sin embargo, las células Toledo demostraron una mayor capacidad clonogénica después del tratamiento con ribavirín en comparación con Hut78 y Pfeiffer.

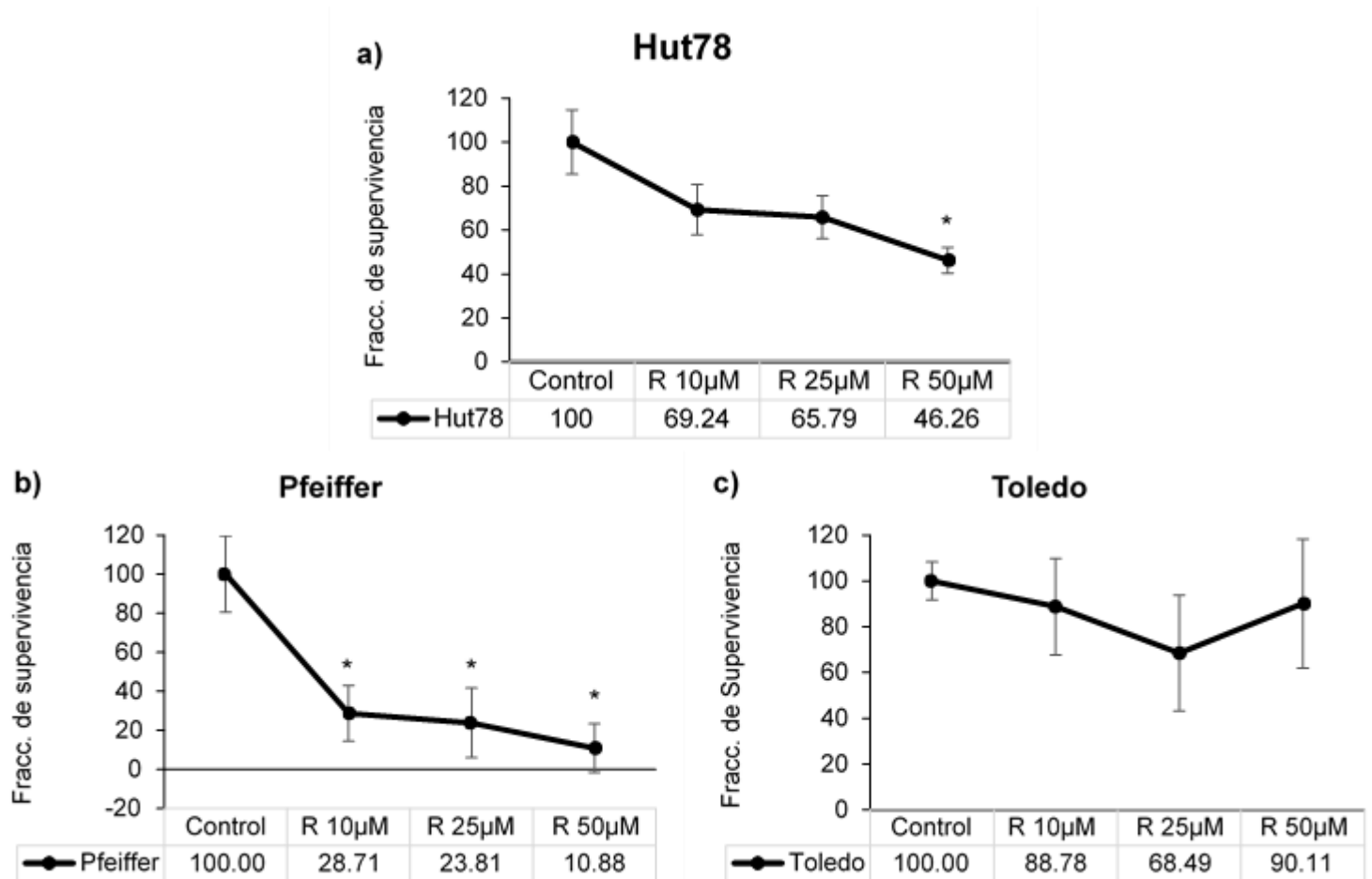


Figura 7. Efecto del ribavirín sobre la capacidad clonogénica. Efecto del ribavirín sobre la capacidad clonogénica (fracción de supervivencia) de las líneas de Linfoma no Hodgkin Hut78 (a), Pfeiffer (b) y Toledo (c) durante ocho días de incubación posterior al tratamiento. Los resultados son el promedio de un experimento realizado por triplicado. R= ribavirín. * El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianzas (ANOVA) y las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron por la prueba de Dunnet utilizando el programa computacional GraphPad Prism versión 5. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Ribavirín no afecta los niveles de la proteína EZH2 en líneas celulares de linfoma no Hodgkin

Un trabajo previo demostró que el tratamiento con ribavirín disminuye los niveles de EZH2 *in vitro* en células de carcinoma mamario (MCF7) y próstata (PC3) (De la Cruz-Hernández et al., 2014). Por lo que a continuación se analizó si el

tratamiento con ribavirín induce cambios sobre los niveles de EZH2 en células de linfoma no Hodgkin Hut78, Pfeiffer y Toledo. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con ribavirín no afecta los niveles de EZH2 en ninguna de las tres líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo (Figura 8).



Figura 8. Efecto del ribavirín en los niveles de la proteína EZH2. Las líneas celulares de linfoma no Hodgkin Hut78, Pfeiffer y Toledo fueron tratadas con ribavirín por 120 horas y como control positivo se utilizaron células tratadas con DZNep.

Ribavirín no afecta los niveles de H3K27me3 en linfoma No Hodgkin

EZH2 es una metiltransferasa de histonas la cual tiene como blanco la monometilación de H3K27 en una célula normal, sin embargo, en células tumorales se ha observado una ganancia de función que resulta en la trimetilación de H3K27 asociada a la mutación A677G, que induce represión génica (McCabe et al, 2012). Interesantemente, un trabajo reciente en nuestro laboratorio demostró que el tratamiento con ribavirín disminuye los niveles de H3K27 trimetilada en líneas celulares de carcinoma mamario MCF-7 y próstata PC3 (De la Cruz-Hernández et al., 2014).

Con base en estos antecedentes se analizó el efecto de ribavirín sobre los niveles de H3K27me3 en las líneas celulares de linfoma no Hodgkin Hut78, Pfeiffer y Toledo. Como se observa en la figura 9, nuestros resultados no demostraron

ningún efecto sobre la trimetilación de H3K27 en ninguna de las líneas celulares de linfoma no Hodgkin Hut78, Pfeiffer y Toledo como se había reportado anteriormente en las líneas de carcinoma mamario MCF-7 y próstata PC3.



Figura 9. Efecto del ribavirín sobre los niveles de la marca represiva H3K27me3. Las células de linfoma no Hodgkin Hut78, Pfeiffer y Toledo fueron tratadas con diferentes dosis de ribavirín por 120 horas. El tratamiento con DZNep fue utilizado como control positivo.

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el ribavirín, al igual que el DZNep, disminuye la viabilidad de las líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes (Pfeiffer y Toledo) de tipo no Hodgkin de manera dosis dependiente. Interesantemente, las células de linfoma cutáneo de células T, Hut78 mostraron una mayor sensibilidad al tratamiento con ribavirín. Estos resultados concuerdan con lo reportado debido a que se había demostrado que el ribavirín disminuye la viabilidad celular en carcinoma mamario y cáncer de próstata (De la Cruz-Hernández et al., 2014).

Por otro lado, también se demostró que el tratamiento con ribavirín inhibe la capacidad clonogénica de manera más evidente en las células Pfeiffer, e interesantemente, esta línea celular es la que presenta la mutación A677G en EZH2, a diferencia de la línea celular Toledo la cual demostró un menor efecto de

ribavirín sobre la capacidad clonogénica. Por lo que nuestros resultados sugieren que el efecto de ribavirín a largo plazo podría ser dependiente del estado de EZH2.

A continuación, evaluamos si el tratamiento con ribavirín tiene algún efecto sobre los niveles de EZH2 y sobre la trimetilación de H3K27 en líneas celulares Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin, sin embargo, nuestros resultados no demostraron ningún efecto del ribavirín sobre los niveles de EZH2 y la trimetilación de H3K27, como se había reportado en células de carcinoma mamario MCF-7 y de cáncer de próstata PC3 (De la Cruz Hernández et al, 2014). Estos resultados sugieren que el efecto de ribavirín como inhibidor de EZH2 y de la trimetilación de H3K27 podría ser específico del tipo celular y que en este caso podrían estar involucrados otros blancos en la regulación de la proliferación celular. Con respecto a lo anterior, existen evidencias de que el ribavirín tiene más de un blanco terapéutico en diferentes tipos de cáncer, uno de ellos es el factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) el cual promueve la traducción de proteínas asociadas a la regulación del ciclo celular (ciclina D), apoptosis (Mcl-1), angiogénesis (VEGF), además se ha visto que se sobreexpresa en cáncer de mama, próstata y leucemia mieloide aguda (Shi et al., 2015).

Estudios recientes en pacientes con cáncer de mama y leucemia mieloide aguda demostraron que el efecto antitumoral del tratamiento con ribavirín está regulado por eIF4E (Pettersson et al., 2011; Assouline et al., 2009; Kraljacic et al., 2011). Otro ensayo preclínico en pacientes con leucemia mieloide aguda demostró que el tratamiento con ribavirín indujo una remisión completa, 2 remisiones parciales, 4

enfermedades estables y 2 enfermedades progresivas. Este estudio también se demostró que el ribavirín causa relocalización de eIF4E nuclear a citoplasma y la reducción de estos niveles fue asociada con la respuesta clínica (Assouline., 2009). Esta relocalización también reduce la exportación de blancos dependientes de eIF4E como NBS1 y ciclina D1, e interesantemente, NBS1 es un regulador corriente arriba de Akt (Tan et al., 2008). Interesantemente también se ha visto que eIF4E está sobreexpresado en el 30% de los casos de leucemia mieloide aguda y en el 50% de cáncer de mama (Pettersson F., 2011, Tan et al., 2008).

Otro estudio reciente demostró que el ribavirín tiene un efecto anti-proliferativo en células de leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda a través de la desregularización de Akt, mTOR 4EBP1 en la vía de señalización mTOR/eIF4E, y MEK, ERK, Mnk1 y eIF4E en la vía de señalización ERK/Mnk1/eIF4E (Shi F. et al., 2015).

Por lo que podemos considerar que existen otros blancos del ribavirín implicados en la disminución de la proliferación celular e inhibición de la capacidad clonogénica en células Hut78, Pfeiffer y Toledo de linfoma no Hodgkin los cuales será importante analizar posteriormente.

Conclusión

Este trabajo sugiere que el ribavirín podría considerarse como un candidato en el reposicionamiento farmacéutico para el tratamiento de linfomas no Hodgkin debido a que se demostró que tiene un efecto como inhibidor de la proliferación y capacidad clonogénica en líneas celulares de linfoma no Hodgkin.

Perspectivas

Realizar un microarreglo para determinar las vías de señalización reguladas por el tratamiento con ribavirín e implicadas en el efecto inhibitorio de la proliferación celular.

Bibliografía

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Aug;3(8):673-83. Review. PubMed PMID: 15286734.

Assouline S, Culjkovic B, Cocolakis E, Rousseau C, Beslu N, Amri A, et al. Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood* 2009; 114(2):257–60. doi: 10.1182/blood-2009-02-205153 PMID: 19433856.

Caimi PF, Hill BT, Hsi ED, Smith MR. Clinical approach to diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev.* 2016 Nov;30(6):477-491. doi:10.1016/j.blre.2016.06.003. Review. PubMed PMID: 27596109.

Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Apr;14(2):155-64. Review. PubMed PMID: 15196462.

Casulo, C y Rich, L. (2013). Non-Hodgkin Lymphoma. *Leukemia and Lymphoma Society.* 800.955.4572.

Cervera E, Candelaria M, López-Navarro O, Labardini J, Gonzalez-Fierro A, Taja-Chayeb L, Cortes J, Gordillo-Bastidas D, Dueñas-González A. Epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate reverses imatinib resistance in patients with chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012 Jun;12(3):207-12. doi: 10.1016/j.clml.2012.01.005. PubMed PMID: 22420986.

Chase A, Cross NC. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 May 1;17(9):2613-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2156. Epub 2011 Mar 2. Review. PubMed PMID: 21367748.

Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood.* 2010 Sep 23;116(12):2040-5. doi: 10.1182/blood-2010-03-276246. Epub 2010 Jun 14. PubMed PMID: 20548096; PubMed Central PMCID: PMC2951853.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346:235–42.

Conway E, Healy E, Bracken AP. PRC2 mediated H3K27 methylations in cellular identity and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Dec;37:42-8. doi: 10.1016/j.ceb.2015.10.003. Review. PubMed PMID: 26497635.

Damsky WE, Choi J. Genetics of Cutaneous T Cell Lymphoma: From Bench to Bedside. *Curr Treat Op Oncol.* 2016;17:33.

De la Cruz-Hernandez E, Medina-Franco JL, Trujillo J, Chavez-Blanco A, Dominguez-Gomez G, Perez-Cardenas E, Gonzalez-Fierro A, Taja-Chayeb L, Dueñas-Gonzalez A. Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug. *Oncol Rep.* 2015 May;33(5):2384-92. doi: 10.3892/or.2015.3816. PubMed PMID: 25738706.

Devata S, Wilcox RA. Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Review with a Focus on Targeted Agents. *Am J Clin Derm.* 2016;17(3):225-237.

Dueñas-González A, García-López P, Herrera LA, Medina-Franco JL, González-Fierro A, Candelaria M. The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Mol Cancer.* 2008 Oct 23;7:82. doi: 10.1186/1476-4598-7-82. Review. PubMed PMID: 18947424; PubMed Central PMCID: PMC2615789.

Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, Pacini R, Alunni C, Natali-Tanci L, Ugolini B, Sebastiani C, Cattoretti G, Pileri S, Dalla-Favera R, Stein H. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood.* 2000 Mar 15;95(6):2084-92. Erratum in: *Blood.* 2013 Oct 3;122(14):2523. PubMed PMID: 10706878.

Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010; 28:4184–90.

Glazer RI, Hartman KD, Knode MC, Richard MM, Chiang PK, Tseng CK, Marquez VE. 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Mar 13;135(2):688-94. PubMed PMID: 3457563.

Iacobuzio-Donahue CA. Epigenetic changes in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:229-49. doi: 10.1146/annurev.pathol.3.121806.151442. Review. PubMed PMID: 18840073.

Juárez L, Rincón C. Linfomas cutáneos: fisiopatología y clasificación (primera parte). *Dermatología Rev Mex.* 2005;49:109-22.

Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, Savin R, DeVillez R, Bergfeld W. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39:578–89.

Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med.* 2016 Feb;22(2):128-34. doi: 10.1038/nm.4036. Review. PubMed PMID: 26845405; PubMed Central PMCID: PMC4918227.

Kleer CG, Cao Q, Varambally S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 11606-11.

Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholik NM, Huang KC, Xiao Y, Kadowaki T, Uesugi M, Kuznetsov G, Kumar N, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Waters NJ, Smith JJ, Porter-Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Uenaka T, Pollock RM, Kuntz KW, Yokoi A, Keilhack H. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2014 Apr;13(4):842-54. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0773. Epub 2014 Feb 21. PubMed PMID: 24563539.

Konze KD, Ma A, Li F, Barsyte-Lovejoy D, Parton T, Macnevin CJ, Liu F, Gao C, Huang XP, Kuznetsova E, Rougie M, Jiang A, Pattenden SG, Norris JL, James LI, Roth BL, Brown PJ, Frye SV, Arrowsmith CH, Hahn KM, Wang GG, Vedadi M, Jin J. An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem Biol.*

2013;8(6):1324-34. doi: 10.1021/cb400133j. PubMed PMID:23614352; PubMed Central PMCID: PMC3773059.

Kraljacic BC, Arguello M, Amri A, Cormack G, Borden K. Inhibition of eIF4E with ribavirin cooperates with common chemotherapies in primary acute myeloid leukemia specimens. *Leukemia* 2011; 25 (7):1197–200. doi: 10.1038/leu.2011.57 PMID: 21455212.

Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):343-9. doi: 10.1038/nature09784. Review. PubMed PMID: 21248841; PubMed Central PMCID: PMC3760771.

Mathas S, Hartmann S, Küppers R. Hodgkin lymphoma: Pathology and biology. *Semin Hematol*. 2016 Jul;53(3):139-47. doi:10.1053/j.seminhematol.2016.05.007. Review. PubMed PMID: 27496304.

McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, Chen SB, Della Pietra A 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, Tummino PJ, Kruger RG, Brandt M, Schwartz B, Creasy CL. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):2989-94. doi: 10.1073/pnas.1116418109. PubMed PMID:22323599; PubMed Central PMCID: PMC3287005.

Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L: The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004,13:139-142.

Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE, Jones PA. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther*. 2009 Jun;8(6):1579-88. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0013. PubMed PMID: 19509260; PubMed Central PMCID:PMC3186068.

Pettersson F, Yau C, Dobocan MC, Culjkovic-Kraljacic B, Retrouvey H, Puckett R, et al. Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(9):2874–84. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2334 PMID: 21415224.

Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, Zeng J, Li M, Fan H, Lin Y, Gu J, Ardayfio O, Zhang JH, Yan X, Fang J, Mi Y, Zhang M, Zhou T, Feng G, Chen Z, Li G, Yang T, Zhao K, Liu X, Yu Z, Lu CX, Atadja P, Li E. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec 26;109(52):21360-5. doi: 10.1073/pnas.1210371110. PubMed PMID: 23236167; PubMed Central PMCID: PMC3535655.

Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O, Thiéblemont C, Bosly A, Laurent G, Morschhauser F, Ghesquières H, Jardin F, Bologna S, Fruchart C, Corront B, Gabarre J, Bonnet C, Janvier M, Canioni D, Jais JP, Salles G, Tilly H; Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011 Nov 26;378(9806):1858-67. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61040-4. PubMed PMID: 22118442.

Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Jun;13(3):263-73. Review. PubMed PMID: 11343896.

Romero-Guadarrama, MB, Hernández-González, MM, Durán-Padilla, MA, Mandujano-Álvarez, G, Alcántara-Vásquez, A. (2996). Linfoma B difuso de células grandes. Características patológicas y de inmunofenotipo en 148 pacientes estudiados en el Hospital General de México. *Revista médica del Hospital General de México S.S.* Vol 69, Num4, pp 192-198.

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Dec;8(12):983-94. Review. PubMed PMID: 18037899; PubMed Central PMCID:PMC4690530.

Saulite I, Hoetzenecker W, Weidinger S, et al. Sézary Syndrome and Atopic Dermatitis: Comparison of Immunological Aspects and Targets. *Biomed Res Inter.* 2016.

Shi F, Len Y, Gong Y, Shi R, Yang X, Naren D, Yan T. Ribavirin Inhibits the Activity of mTOR/eIF4E, ERK/Mnk1/eIF4E Signaling Pathway and Synergizes with Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib to Impair Bcr-Abl Mediated Proliferation and Apoptosis in Ph⁺ Leukemia. *PLoS One.* 2015 Aug 28;10(8):e0136746. doi:10.1371/journal.pone.0136746. PubMed PMID: 26317515; PubMed Central PMCID: PMC4552648.

Shipman AR, Scarisbrick J. New Treatment Options for Mycosis Fungicides. *Indian J Dermatol.* 2016;61(1):119.

Sidwell RW, Robins RK, Hillyard IW. Ribavirin: an antiviral agent. *Pharmacol Ther.* 1979;6(1):123-46. Review. PubMed PMID: 390559.

Siles R, Grazna L, Moreira F, et al. Micosis fungoide: revisión de tema y presentación de un caso. *Rev costarric salud pública.* 2007;16(30).

Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B, Godio L, Patterson S, Rodriguez-Bigas MA, Jester SL, King KL, Schumacher M, Abbruzzese J, DuBois RN, Hittelman WN, Zimmerman S, Sherman JW, Kelloff G. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 2000 Jun 29;342(26):1946-52. PubMed PMID: 10874062.

Swerdlow SH, et al. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.

Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 2007 May 1;21(9):1050-63. Epub 2007 Apr 16. PubMed PMID: 17437993; PubMed Central PMCID: PMC1855231.

Tan K, Culjkovic B, Amri A, Borden KL. Ribavirin targets eIF4E dependent Akt survival signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Oct 4;375(3):341-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.163. PubMed PMID: 18706892; PubMed Central PMCID: PMC2573464.

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 2002 Oct 10;419(6907):624-9. PubMed PMID: 12374981.

Verdonck LF, van Putten WL, Hagenbeek A, Schouten HC, Sonneveld P, van Imhoff GW, Kluijn-Nelemans HC, Raemaekers JM, van Oers RH, Haak HL, et al. Comparison of CHOP chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for slowly responding patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1995;Apr 20;332(16):1045-51. PubMed PMID: 7898521.

Verma, S. K., Tian, X., LaFrance, L. V., Duquenne, C., Suarez, D. P., Newlander, K. A., Romeril S. P, Burgess J. L. Miller, W. H. (2012). Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(12), 1091–1096. <http://doi.org/10.1021/ml3003346>

Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. *Int J Biol Sci.* 2012;8(1):59-65. Epub 2011 Nov 18. Review. PubMed PMID:22211105; PubMed Central PMCID: PMC3226033.