



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE HIDRALAZINA Y VALPROATO DE
MAGNESIO Y SU COMPARACIÓN CON VORINOSTAT Y DECITABINA EN UNA
LÍNEA CELULAR DE LINFOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS T

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BEATRIZ SANTAMARÍA JIMÉNEZ

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
Unidad Periférica, INCAN. Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Héctor Mayani Viveros
Hospital de oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Ciudad de México. Febrero, 2019.



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas se realizó bajo la dirección del Dr. Alfonso Dueñas González en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer en la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología.

El comité Tutorial que asesoro el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Marcela Lizano Soberón: Instituto de Investigaciones Biomédicas

Héctor Mayani Viveros: Hospital de oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI

Se reconoce la colaboración como Asesoras Técnicas y Académicas a la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez y la Dra. Alma Delia Chávez Blanco en el desarrollo de esta Tesis.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 549459.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en Febrero de 2019

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Vocal: Dra. Ana María Salazar Martínez

Vocal: Dra. María Antonieta Chávez González

Vocal: Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra

Secretario: Dr. Greco Hernández Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alfonso Dueñas González por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por haberme guiado durante la realización del proyecto.

Agradezco al programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas y a la Universidad Autónoma de México por la formación académica que me brindaron.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Marcela Lizano y el Dr. Héctor Mayani, así como a los miembros del jurado: Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra, Dr. Greco Hernández Ramírez, Dra. María Antonieta Chávez González, Dra. Ana María Salazar Martínez, Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por apoyarme con la corrección y la evaluación de la tesis.

A la Dra. Lupita por haberme orientado y por su apoyo incondicional a lo largo de este proyecto.

A Alma, Caty, Enrique, Lucy y Diana ya que ellos fueron parte de mi formación académica, gracias por sus consejos y a mis compañeros de laboratorio que me apoyaron durante mi estancia en el Instituto: Clara, Ytzal, Blanca, Mau, Caty.

A mis padres por haberme dado las bases para poder desarrollarme en la vida, Gracias por el cariño, los consejos y el apoyo incondicional.

A mis hermanas: Magda, Sara y Daniela, a mi sobrinos Sofy y a Rodri que son tan importantes en mi vida y a toda mi familia, por su cariño, por consentirme y por creer en mí.

A mi amigo Rogelio por estar conmigo en las en las buenas y en las malas, por su apoyo y amistad y por inspirarme a seguir creciendo profesionalmente.

A mis amigos: Janeth, Daniel San, Quetzalli, Diana, gracias por su amistad que perdura a pesar del tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Cáncer y neoplasias hematológicas	7
Linfoma cutáneo de células T	8
Modificaciones epigenéticas.....	12
Metilación del ADN.....	13
Acetilación/desacetilación de histonas.....	16
Terapia epigenética en cáncer.....	19
Inhibidores de las DNMTs	20
Inhibidores de HDACs.....	22
Valproato de magnesio.....	23
Vorinostat (SAHA).....	24
ANTECEDENTES	26
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Líneas celulares y cultivo celular	29
Determinación de la viabilidad celular	29
Análisis de la combinación de fármacos.....	30
Evaluación de sinergismo.	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
<i>Efecto del tratamiento con hidralazina, valproato de magnesio, decitabina y vorinostat sobre la viabilidad de las células Hut78 de linfoma cutáneo de células T.</i>	32
<i>Efecto del tratamiento con la combinación hidralazina y valproato de magnesio sobre la viabilidad de las células Hut 78 de linfoma cutáneo de células T.</i>	36
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS	45

ABREVIATURAS

LCCT: linfoma cutáneo de células T

ncARN: ARN no codificante

DNMTs: ADN metiltransferasas

HATs: enzimas histona acetiltransferasas

HDACs: enzimas histona desacetilasas

iHDACS: inhibidores de las enzimas desacetilasas de histonas

iDNMTs: inhibidores de las enzimas ADN metiltransferasas

SAHA: ácido hidroxámico suberoilánido

RESUMEN

Las células de linfoma cutáneo de células T (LCCT) presentan resistencia a apoptosis y proliferación celular descontrolada debido a alteraciones genéticas y epigenéticas; sin embargo, el LCCT ha demostrado tener una buena respuesta clínica a los inhibidores de las desacetilasas de histonas, como el vorinostat.

Por otro lado, estudios preclínicos sugieren que el uso de la combinación con fármacos inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDAC) e inhibidores de ADN metiltransferasas (iDNMT), puede ofrecer mejores resultados que el uso de los fármacos por separado. Además, se ha observado que el reposicionamiento terapéutico de drogas como la hidralazina (un agente desmetilante del ADN) y el valproato de magnesio (un inhibidor de las desacetilasas de histonas) tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de algunos tipos de cáncer, no obstante, su efecto no se ha demostrado en linfoma cutáneo de células T.

Con base en estos antecedentes, el objetivo de este proyecto es determinar el efecto sobre la viabilidad en células de linfoma cutáneo de células T, HuT 78, con el tratamiento con hidralazina y valproato de magnesio, y comparar el efecto de esta combinación contra la combinación de decitabina y vorinostat, inhibidores también de la metilación del ADN y de las desacetilasas de histonas, respectivamente.

Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con los cuatro fármacos por separado disminuyó la viabilidad celular de la línea de linfoma cutáneo de células T HuT 78 de manera dosis-dependiente. Por otra parte, se investigó el efecto de la combinación con hidralazina y valproato de magnesio, la cual también provocó una disminución de manera significativa en la viabilidad celular. Además, el análisis de la interacción farmacológica con el programa SigmaPlot demostró que una mayor sinergia de hidralazina valproato en comparación con decitabina y vorinostat, lo cual sugiere que este tipo de fármacos que actúan a nivel epigenético podrían ser visualizado para realizar más estudios en otros tipos celulares y ser contemplados en un futuro para ser evaluado en estudios preclínicos como alternativa de tratamiento en algunos tipos de neoplasia.

INTRODUCCIÓN

Cáncer y neoplasias hematológicas

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se desarrollan a partir de diversos procesos que incluyen iniciación, promoción y progresión¹ (Figura 1). La principal teoría de la carcinogénesis involucra la acumulación de defectos genéticos, entre ellos mutaciones, deleciones, inversiones y duplicaciones, que conllevan a una desregulación de la homeostasis celular². Estos defectos llevan a la activación de oncogenes y afectan la función de los genes supresores de tumor², así como a una pérdida de control en la señalización celular, provocando un crecimiento celular continuo, evasión de apoptosis, inestabilidad cromosómica y finalmente una transformación celular¹.

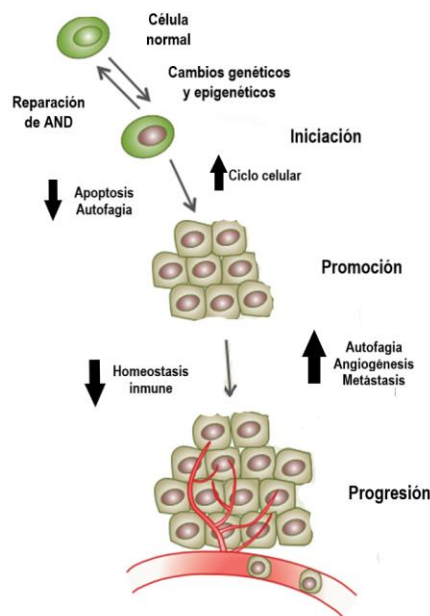


Fig 1. Célula maligna (modificada de Li, et al 2016)

Las células tumorales muestran una expresión genética anormal e inestabilidad genómica³ que resulta en una alteración del ciclo celular debido a una falla en los puntos de control y defectos en los procesos de apoptosis. Estas características son cruciales para el fenotipo maligno, ya que permiten un aumento en la proliferación celular, el crecimiento tumoral y su diseminación metastásica⁴.

Las neoplasias hematológicas representan un tipo de cáncer que son clínica, morfológica e inmunológicamente heterogéneas y que engloban mielomas, leucemias y linfomas. Los mielomas y las leucemias se derivan de los órganos hematopoyéticos primarios, es decir, la médula ósea y la sangre, respectivamente, y los linfomas se originan, usualmente, de órganos linfáticos como los nódulos linfáticos, pero pueden ocurrir en casi cualquier tejido⁵.

En general, el sistema hematopoyético es particularmente sensible a la desregulación de la apoptosis debido a que las células hematológicas tienen una alta tasa de renovación y deben mantener un equilibrio entre la proliferación y apoptosis, lo cual es determinante en la generación de neoplasias hematológicas, ya que cambios en las proteínas que regulan dichos procesos pueden llevar a la transformación celular y dar lugar al desarrollo de una gran variedad de neoplasias linfoides⁵.

Los linfomas se dividen en dos grupos: linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. El linfoma no Hodgkin representa la mayoría de los linfomas y un 4% de todos los tipos de cáncer diagnosticados cada año, puede presentarse en células B, en células T, o en células Natural Killer⁶.

Linfoma cutáneo de células T

El linfoma cutáneo primario es el segundo más común de los linfomas extranodales de tipo no Hodgkin, con una incidencia anual estimada de 1/100 000 habitantes al año en el mundo y ha ido en aumento desde 1990⁷. El 75% de los casos de linfoma cutáneo reportado es derivado de células T, aproximadamente, y el resto es derivado de células B y células Natural Killer⁸.

En México, el porcentaje de morbilidad hospitalaria en la población menor de 20 años para tumores de sistema linfático y tejidos afines es de 5.6 % en hombres y de 5.8% en mujeres; para la población mayor de 20 años el porcentaje es de 9.2% para hombres⁹. Por otra parte, en 2006 se reportó un total de 144 casos de linfoma de células T periférico y cutáneo, lo que indica que los linfomas cutáneos son una

neoplasia poco común, como se ha descrito anteriormente, aunque es probable que haya casos de linfoma cutáneo mal diagnosticados¹⁰.

El linfoma cutáneo de células T (LCCT) comprende un grupo de enfermedades clínica e histopatológicamente heterogéneas de tipo linfoproliferativas, que se caracterizan por una expansión clonal de las linfocitos T hacia la piel¹¹. Estos linfomas son más frecuentes entre los 40 y 60 años y es mayor la incidencia en pacientes del sexo masculino que en el femenino^{12, 8}. Los dos tipos más comunes de LCCT son la micosis fungoide y el síndrome de Sézary¹¹.

El LCCT se restringe a la piel durante las primeras etapas de la enfermedad están relacionadas a un pronóstico favorable con una supervivencia del 49% a 100% a 5 años¹³. Por otra parte, la diseminación sistémica de células malignas a otros órganos ocurre sólo en las etapas más avanzadas y se caracterizan por una baja tasa de supervivencia a 5 años que va del 0% al 39%, aproximadamente^{13, 14}.

La micosis fungoides, se caracteriza por presentar parches y placas, sobretodo en áreas no expuestas de la piel, que evolucionan a tumores en la piel. También se puede presentar eritroderma y afectación a ganglios linfáticos, así como a otros órganos internos¹². Las células neoplásicas presentan un núcleo cerebriforme y marcadores de células T como: CD3+, CD4+, CD45RO+, CLA+, CCR+; y carecen de los marcadores: CD8- CD26-¹². Dentro de las características histológicas de la enfermedad se encuentran el infiltrado linfocítico a la dermis debido a la existencia de un epidermotropismo y la formación de microabscesos de Pautrier, que es una acumulación de clonas de células T alrededor de las células de Langerhans¹⁵.

La micosis fungoide se considera como una neoplasia de tipo indolente y de lenta evolución y es posible que los síntomas se presenten en un período prolongado que varía de 2 a 10 años, con erupciones cutáneas episódicas¹⁵; sin embargo, conforme se desarrolla la enfermedad, puede provocar la muerte debido a la transformación de células T, las cuales pierden la predilección al microambiente de la piel y se modifican de tal manera que son capaces de expandirse a sangre periférica, nódulos linfáticos y a otros órganos¹⁵.

Los pacientes con micosis fungoide en las primeras etapas tienen una alta tasa de supervivencia de 20 años o más y muestran una progresión lenta. No obstante, del 25 al 30% de los pacientes la enfermedad evoluciona a etapas avanzadas y están asociados a un mal pronóstico^{10, 13}.

El síndrome de Sézary es un tipo de LCCT menos común, ya que representa sólo el 5 % de los casos¹³. Es una neoplasia más agresiva en la cual se presentan tumores en piel, eritroderma generalizada, linfadenopatía, hiperqueratosis, prurito y células leucémicas en sangre periférica llamadas células de Sézary. Las células T tumorales presentan marcadores como: CD3+, CD4+, CD45RO+, CLA+; y carecen de los marcadores: CD8-, CD30-^{12, 14}.

La expectativa de vida en los pacientes con síndrome de Sézary es menor que en los pacientes con micosis fungoide. El pronóstico de supervivencia es de 2-4 años en promedio. Los pacientes con un mal pronóstico tienen un 30% de supervivencia que va de los 5 años a partir del diagnóstico^{10, 12, 14}.

Los pacientes que están en las primeras etapas de esta enfermedad (parches y placas) tienen un buen pronóstico y el riesgo de progresión dentro de los siguientes 10 años es de 5-10%. En etapas más avanzadas, cuando se ve afectado más del 10% de su superficie corporal, tienen una supervivencia media mayor a 11 años y la frecuencia de progresión de la enfermedad es de 20-24%. Cuando se presentan tumores cutáneos el pronóstico empeora con una supervivencia media de 4-6 años y una supervivencia de 5 años entre el 70-80% de los casos reportados¹².

Cuando se presenta eritroderma la supervivencia es del 40% a los 5 años y del 20 % a los 10 años. En los pacientes con afectación ganglionar y visceral se presenta una supervivencia menor de 2 años¹².

El tratamiento del LCCT depende de varios factores, entre los cuales están el estado de salud del paciente, la edad, las manifestaciones clínicas que presente y la etapa de la enfermedad. En las primeras etapas, en las que la enfermedad se limita a afectaciones en la piel, los tratamientos son tópicos, con el objetivo de mejorar los síntomas y evitar tratamientos tóxicos⁸. Por su parte, las terapias sistémicas se

utilizan cuando la enfermedad se encuentra en etapas más avanzadas o en pacientes refractarios^{11, 8}.

Las terapias dirigidas a la piel incluyen: fototerapia, radiación, quimioterapia tópica o cremas cutáneas con corticosteroides. El tratamiento para pacientes con micosis fungoide y síndrome de Sézary, en las etapas avanzadas, generalmente comprende tratamientos como: terapias biológicas o inmunitarias, tratamientos con inhibidores de las desacetilasas de histonas, fármacos quimioterapéuticos convencionales o en combinación con otros fármacos¹⁶. En la Tabla 1 se muestran las terapias para LCCT^{16, 17}.

Tabla 1. Terapias utilizadas en el linfoma cutáneo de células T

Terapias dirigidas a piel	<ul style="list-style-type: none"> • Corticosteroides tópicos • Quimioterapia tópica: mostaza nitrogenada y carmustina • Retinoides: bexaroteno y tazaroteno • Fototerapia: PUVA, UVB
Radioterapia	<ul style="list-style-type: none"> • Radioterapia con electrones, sola o en combinación con otras terapias
Terapias sistémicas	<ul style="list-style-type: none"> • Terapias biológicas o inmunitarias: Retinoides, interferones, fotoféresis extracorporeal y terapias con anticuerpos • Quimioterapia: metotrexato, gemcitabina, doxorubicina, clorambucil, etopósido • Anticuerpo monoclonal: Alemtuzumab • Inhibidores de histona desacetilasa: <ul style="list-style-type: none"> ○ Vorinostat ○ Romidepsina • Fotoféresis

<p>Terapias de combinación</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fototerapia y bexaroteno • Fototerapia e interferón • Fototerapia y fotoféresis • Radioterapia cutánea total con rayo de electrones y fotoféresis • Bexaroteno e interferón • Bexaroteno y denileucina diftitox • Fotoféresis y bexaroteno • Fotoféresis e interferón • Fotoféresis, bexaroteno e interferón
<p>Terapias y medicamentos nuevos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de antifolatos: Pralatrexato • Inhibidores del proteosoma: bortezomib • Alotransplante de células troncales

El LCCT se ha asociado con mutaciones, inestabilidad de microsatélites y reordenamiento cromosómico (duplicación, delección, inversión y translocación)^{15, 18}. Algunos ejemplos son delecciones en los genes CDKN2A y RB1 involucrados en la regulación del ciclo celular; genes relacionados con la reparación del ADN como son TP53 y ATM; y, genes involucrados en la regulación de apoptosis como TNFDFN10A y FAS¹⁸.

De igual manera, las células T malignas de los pacientes con LCCT presentan alteraciones epigenéticas que afectan la funcionalidad celular y la homeostasis^{15, 18,19}, como la hipermetilación generalizada de promotores en diversos genes supresores de tumor que coinciden con modificaciones de histonas¹⁸.

Modificaciones epigenéticas

La epigenética se define como el estudio de las modificaciones heredables que regulan la expresión genética y que no involucran un cambio en la secuencia de

nucleótidos^{20, 21}. Estas modificaciones postraduccionales se dan en la estructura de ADN o en las proteínas asociadas a él y por lo general son reversibles²⁰.

Los procesos epigenéticos son de gran importancia al permitir un nivel de plasticidad celular necesario para el establecimiento de los programas de expresión génica específicos de cada linaje celular²² durante la diferenciación celular, el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la estabilidad genómica²³.

Las modificaciones epigenéticas incluyen: metilación de ADN, modificación postranscripcional de histonas como acetilación, metilación, fosforilación, deiminación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación e isomerización de prolina, y regulación génica por ARN no codificante (ncARN)²⁴.

Los cambios en los patrones epigenéticos repercuten en la regulación de la estructura de la cromatina y pueden reclutar proteínas efectoras que influyen en la expresión génica, la replicación y reparación del ADN, así como en la condensación y segregación de los cromosomas. De esta manera estos cambios conllevan a la regulación de la proliferación, supervivencia, y motilidad celular²⁵.

Dado que estas modificaciones epigenéticas tienen un papel muy importante en la regulación de la expresión génica, una alteración en los patrones epigenéticos puede conducir a la inducción y mantenimiento de varios tipos de cánceres²⁰ incluyendo neoplasias hematológicas⁵.

La metilación del ADN y la acetilación/desacetilación de histonas son los mecanismos epigenéticos más estudiados y se han encontrado involucrados, específicamente, en el desarrollo de linfoma debido a alteraciones que propician la auto renovación en células malignas, así como una proliferación celular aumentada^{5,6}.

Metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso epigenético esencial para el control de la actividad genética durante el desarrollo normal de las células⁵. Esta modificación juega un papel muy importante en la inactivación del cromosoma X, la impronta

genómica, la supresión de elementos repetitivos, así como para la estabilidad genómica^{5, 6}.

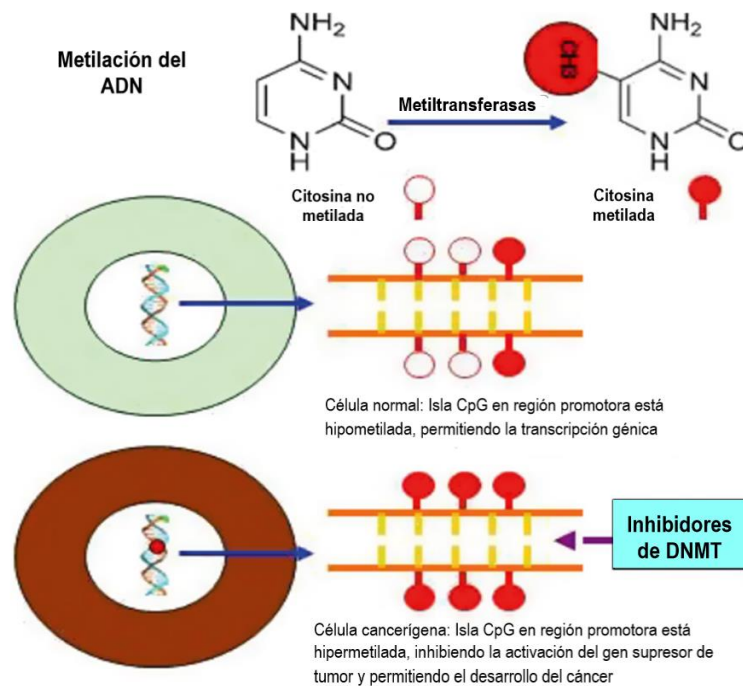


Figura 2. Metilación de ADN (modificada de Mummaneni, et al 2014)

En los humanos, la metilación se lleva a cabo en citosinas en la posición 5', principalmente en regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos, llamadas dinucleótidos CpGs. Entre estos sitios se encuentran pequeñas secuencias asociadas a genes que, generalmente, se encuentra sin metilar, las islas CpG^{26, 27}, las cuales se esquematizan en la figura 2. La metilación de ADN ha asociado a un estado condensado de la cromatina y a un silenciamiento génico debido a que la adición de grupos metilo no permite que los factores de transcripción interaccionen con el ADN^{22, 23}. Por otra parte la citosina metilada funciona como factor de reconocimiento para los complejos co-represores de proteínas de unión a grupos metilo CpG (MBP)^{22, 23}.

Los patrones de metilación del ADN son coordinados por acción de las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) y factores asociados como las proteínas metiltransferasas de histonas (HMT) en presencia de S-adenosil metionina que sirve

como donador de grupos metilo. La familia de las DNMTs en mamíferos incluye tres miembros activos: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B²⁶. La enzima DNMT1 está involucrada en el mantenimiento de los patrones de metilación que reconoce el ADN hemimetilado y se encarga de la metilación en los nucleótidos recién sintetizados después de la replicación del ADN^{22, 23}. Por otra parte, DNMT3A y DNMT3B actúan como metiltransferasas *de novo*, ya que pueden actuar tanto en cadenas de ADN hemimetiladas como desmetiladas^{22, 27}.

Recientemente, un estudio identificó una nueva ADN metiltransferasas de novo, la DNMT3C, en células germinales murinas. DNMT3C muestra una gran similitud con la DNMT3B, y específicamente metila retrotransposones; sin embargo, también se han incluido dos miembros más la DNMT2 Y DNMT3L. Además, DNMT2 no es actualmente considerada una ADN metilasa, ya que sólo metila pequeños ARNs de transferencia (tARNs). Por otro lado, se ha reportado que la DNMT3L, es un importante regulador sin actividad catalítica que se une a DNMT3A y forman un heterodímero que facilita la metilación de los residuos de citosina^{28, 29}.

La metilación aberrante del genoma puede conducir a una expresión génica alterada que resulte en la linfomagénesis⁶. Generalmente, en células malignas se puede presentar la hipometilación global⁶. Por otra parte, la hipermetilación en las islas CpG que se encuentra en la región promotora del gen, contribuye al silenciamiento o inactivación de dicho gen²¹ (Figura 2). Tal es el caso de la hipermetilación en los sitios promotores de genes supresores de tumor, como P53, RB1, APC, entre otros. Esto genera la represión de la expresión de ciertas proteínas como p21, p16, Bcl2 implicadas en la regulación de la apoptosis e inhibición de crecimiento lo que proporciona una ventaja para la supervivencia de las células maligna^{25, 26}.

Un ejemplo es la hipermetilación de ADN en el gen IDH2 que contribuye a la leucemia mieloide aguda. Así mismo, la hipermetilación de genes supresores de tumor como WT1 RAR β , KLF4, ID4, GATA3, CHD5 y SPI1 se presenta en diferentes tipos de cánceres como en el linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, así como en algunos tipos de leucemia, lo cual sugiere que estas alteraciones epigenéticas pueden presentarse en neoplasias hematológicas⁵.

Acetilación/desacetilación de histonas

Las histonas son proteínas de bajo peso molecular, aproximadamente 11-12 Kd y contienen un 20%, de lisinas y argininas. Estos aminoácidos con cargas positivas en las cadenas laterales de las histonas se unen a los grupos fosfato del ADN (cargados negativamente)³⁰.

Las histonas forman un octámero llamado nucleosoma, que contiene 2 copias de las histonas H3, H4, H2A y H2B, en donde se enrolla el ADN de doble cadena³¹. El ensamblaje del nucleosoma se completa con la adición de la histona de unión H1. Estos complejos tienen como función compactar el ADN y dan lugar a la cromatina³⁰.

Las histonas sufren modificaciones post traduccionales, que regulan la expresión génica, como: metilación, acetilación, fosforilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación y sumoilación^{31, 32}. Esto resulta en una modificación dinámica de la cromatina dependiente del contexto celular. Las modificaciones provocan cambios en la interacción entre las histonas y el ADN, así como el reclutamiento de moléculas efectoras esenciales en procesos como transcripción, replicación y reparación del ADN, además de mantener la estructura y estabilidad de la cromatina ^{23, 31}.

La acetilación de histonas es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas (representada en la figura 3). Es un proceso reversible catalizado por las enzimas acetilasas de histonas (HAT)³¹, las cuales transfieren un grupo acetilo del co-factor CoA al residuo de lisina en la cadena de histonas, neutralizando la carga positiva, lo que debilita la interacción electrostática entre las histonas y el ADN²³. Esto trae como consecuencia una cromatina más laxa que permite el acceso a las proteínas de la maquinaria de transcripción²³.

Las desacetilasas de histonas (HDACs) son enzimas que revierten la acetilación de los residuos de lisina, favoreciendo la compactación de la cromatina al restablecer las cargas positivas de las histonas^{23, 32}.

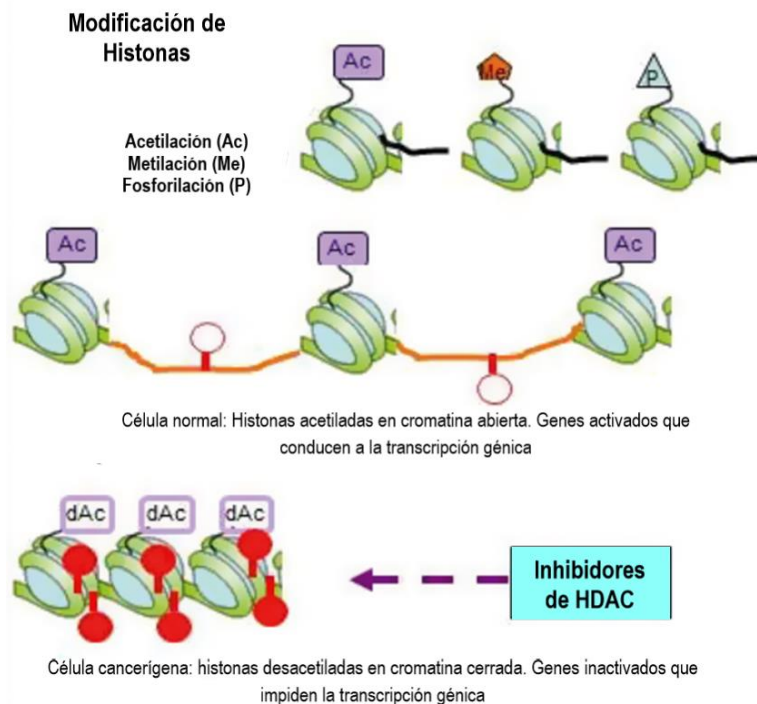


Figura 3. Acetilación de histonas (modificada de Mummaneni, et al 2014)

Las enzimas HDACs se subdividen en Clases dependiendo de la homología de su secuencia como se muestra en la Tabla 2^{2, 33} Las HDACs de la Clase I, II y IV emplean un mecanismo catalítico dependiente del zinc como cofactor y las de Clase III requieren de NAD⁺²⁰.

Tabla 2. Clases de HDACs

Tipo	HDACs	Localización celular	Respuesta biológica
Clase I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Núcleo	ciclo celular diferenciación celular desarrollo tisular
Clase II	HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10	Entre el núcleo y el citoplasma	diferenciación celular desarrollo tisular

Clase IV	HDAC11	Núcleo	regulación negativa de la interleucina 10 regulación de neutrófilos
----------	--------	--------	--

Recientemente, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar el papel que juegan las HDACs en los tumores hematológicos^{5, 20, 23}. Los estudios demuestran la sobreexpresión y sobreactivación de HDACs de forma frecuente. Un estudio demostró la sobreexpresión de HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en linfoma de Hodgkin (HL), y también observaron que una disminución en la expresión de HDAC1 está relacionada con un mal pronóstico en HL²⁴. Por otro lado, en leucemia linfoblástica aguda (ALL) se observó la expresión de HDAC1-11 en estadios tempranos, así como también la sobre-expresión de HDAC1, HDAC2 y HDAC8^{24, 32}.

Otro estudio señaló que la sobre-expresión de HDAC4 se asocia con un aumento en los niveles de células T, lo que predispone a un mal pronóstico. Estos resultados demuestran que HDAC4 podría actuar como un blanco terapéutico en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML). Por otro lado, también se observó que HDAC1, HDAC2 y HDAC6 se encuentran sobre-expresadas en linfoma difuso de células T y linfoma periférico de células T. Con base en estos estudios, HDAC6 podría ser un importante marcador pronóstico asociado con un favorable resultado en linfoma difuso de células T, no así para el linfoma periférico de células T³².

Se ha demostrado que HDAC1 desempeña dos papeles en la regulación de la leucemia promielocítica aguda: como oncosupresor en las primeras etapas y oncogénico en células tumorales establecidas. Se ha observado que la reducción de HDAC1 aceleran dramáticamente la leucemogénesis en ratones preleucémicos transgénicos mediante la inhibición de la actividad de PML-RAR, una oncoproteína que bloquea la diferenciación celular e incrementa la inestabilidad genómica. Por el contrario, células de leucemia que expresan la oncoproteína PML-RAR en ratones knock-down para HDAC1 prolongan su tiempo de supervivencia, lo que sugiere que HDAC1 tiene actividad oncogénica, en células tumorales establecidas³⁴.

Es por ello que las enzimas HDACs podrían considerarse blancos importantes en el estudio del cáncer, ya que alteraciones en los patrones de acetilación y desacetilación de histonas puede contribuir a la linfomagénesis⁶.

Terapia epigenética en cáncer

En particular, los blancos epigenéticos en el tratamiento del cáncer se han enfocado a inhibir las ADN-metiltransferasas y a las desacetilasas de histonas. La azacitidina, la decitabina, el vorinostat y el romidepsin han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del síndrome mielodisplásico y el linfoma cutáneo de células T respectivamente. Por otro lado, las modificaciones epigenéticas han demostrado su valor potencial como biomarcadores en detección temprana, pronóstico y predicción en algunos cánceres²². La terapia epigenética se ha basado principalmente en revertir las modificaciones epigenéticas a través del uso de fármacos inhibidores de enzimas DNMTs y HDACs, y reestablecer la expresión de genes supresores de tumor silenciados en células tumorales, lo que resulta en la activación de proteínas que regulan el ciclo celular, crecimiento celular y apoptosis^{2, 23}.

El vorinostat es un fármaco con actividad inhibidora de HDACs que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de LCCT en pacientes con enfermedad progresiva, persistente o recurrente y en los cuales las terapias sistémicas no han sido exitosas. Interesantemente, en etapas avanzadas ha presentado una tasa de respuesta del 25%-30%^{24, 25}.

La terapia epigenética ha demostrado tener efectos antitumorales importantes en el LCCT tanto *in vitro* como *in vivo*²⁵ probablemente, debido a que las células T malignas presentan alteraciones epigenéticas como la hipermetilación generalizada de promotores en genes supresores de tumor como : p15, p16, p73, relacionados con el control del ciclo celular; SHP, un regulador transcripcional; TMS1 y el receptor de Fas, relacionado con señales de apoptosis; STAT3, involucrado en crecimiento celular y apoptosis; MGMT, MLH1 relacionado con la reparación del ADN; y CHFR, involucrado con inestabilidad cromosómica²⁰. Así mismo se presentan alteraciones en las modificaciones de histonas e inestabilidad cromosómica²⁰.

Inhibidores de las DNMTs

Diversos estudios han demostrado que los inhibidores de las DNMTs (iDNMTs) tienen un efecto antitumoral y son capaces de revertir la metilación anormal del ADN afectando secundariamente la modificación de histonas y re-estableciendo la expresión normal de genes silenciados como p16 y MLH1 y, eventualmente, reducir el crecimiento y la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón^{5, 22}.

Los iDNMTs se clasifican principalmente en dos tipos: análogos de nucleósidos y no análogos de nucleósidos²⁶.

Los iDNMTs análogos de nucleósidos son compuestos que fueron sintetizados primero como agentes citotóxicos, tienen un anillo de citosina modificado lo que les confiere su actividad hipometilante. El mecanismo de acción de estos compuestos está dado por su incorporación al ADN durante su replicación en la fase S del ciclo celular. Una vez en el ADN es capaz de unirse covalentemente con la enzima DNMT en los residuos de citosina, evitando su correcto funcionamiento. Esto resulta en la degradación de las enzimas DNMT y por lo tanto una disminución en los niveles de metilación^{35, 36}.

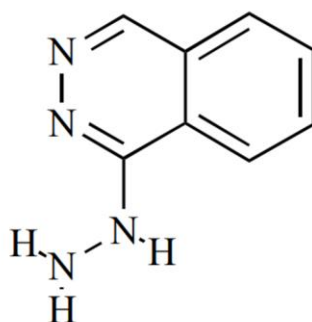
La 5-azacitidina, decitabina y zebularine son algunos ejemplos de iDNMTs^{35, 36}. Estos compuestos son fácilmente hidrolizadas en soluciones acuosas y sufren deaminación por la citidina desaminasa, lo cual les confiere una inestabilidad química que dificulta su aplicación clínica³⁶.

El otro grupo de inhibidores de DNMTs son los no análogos de nucleósidos, los cuales no requieren de su incorporación al ADN por lo que son menos citotóxicos. Estos compuestos pueden inhibir la metilación por unión directa al sitio catalítico de la DNMT³⁷. Entre ellos se incluye a la hidralazina, RG108, MG98, procaína y sus derivados^{35, 36}.

Hidralazina

La hidralazina es un agente vasodilatador utilizado como hipertensivo, que tiene acción como inhibidor de las DNMTs. Su acción se debe a que bloquea la actividad de las enzimas por medio de la interacción de sus grupos nitrógeno con los residuos de Lisina-162 y la Arginina-240 del sitio activo de las DNMTs³⁶, generando una reactivación transcripcional de genes supresores de tumores silenciados por hipermetilación³⁵ (Figura 4).

Aunque este compuesto tiene una actividad hipometilante bastante limitada en células vivas, se ha demostrado que reduce los niveles de DNMT1 y DNMT3 y que es capaz de inhibir el crecimiento de varias líneas celulares malignas y revertir la resistencia a quimioterapia³⁶.



Hidralazina

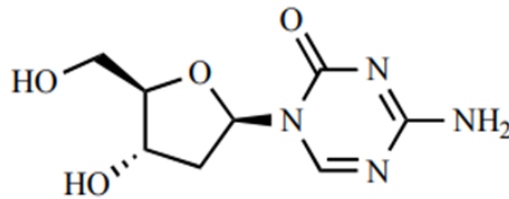
Figura 4. Hidralazina (modificada de Singh et al, 2013)

Por otra parte, la hidralazina, muestra una citotoxicidad baja en comparación con otros inhibidores de DNMT ya que no se incorpora al ADN³⁶; sin embargo, su uso prolongado conlleva el riesgo a desarrollar lupus inducida por medicamentos³⁸.

Decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina)

La decitabina es otro fármaco inhibidor de las enzimas DNMT, en específico inhibe las enzimas DNMT1, DNMT3A Y DNMT3B, por lo tanto, se utiliza de igual manera

como terapia epigenética. En la actualidad, ha sido aprobado para su uso en el tratamiento de síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica crónica^{5, 25}.



Decitabina

Figura 5. Decitabina (modificado de Ganesan et al, 2009)

Este fármaco contiene como base una desoxirribosa (figura 5), por lo que actúa como un agente análogo de nucleósido lo cual le confiere cierta citotoxicidad³⁵.

Se ha encontrado que la terapia con decitabina a bajas concentraciones es capaz de inducir arresto del ciclo celular, diferenciación celular y apoptosis, al revertir el silenciamiento de genes supresores de tumor como CDK1, p15INK4B, entre otros. Asimismo, induce diferenciación en las células leucémicas y de otras células tipo stem en otros tipos de cáncer sin efectos adversos en células normales de médula ósea humana²⁶.

Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con decitabina en altas dosis provoca efectos citotóxicos importantes ya que es capaz de inhibir la síntesis de ADN, y entre los efectos secundarios que provoca están: toxicidad en la médula ósea, mielosupresión, náuseas, vómito y diarrea³⁵.

Inhibidores de HDACs

Los inhibidores de HDACs (iHDACs) muestran una actividad antiproliferativa en una variedad de células transformadas, especialmente en células hematológicas³⁹.

Los iHDACs son capaces de generar un estado de la cromatina descondensado y de restaurar la transcripción génica de genes supresores de tumores como P53, MLH1 y BRCA2^{2, 20}, al favorecer la entrada de los factores de transcripción a los sitios activos del ADN²¹ lo que resulta en una inhibición de la proliferación celular en una variedad de células tumorales⁴⁰.

Por otro lado, se ha demostrado que los iHDACs también induce apoptosis a través del aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas y antiproliferativas como DR5, TNF, p21, p27 y reduce la expresión de proteínas antiapoptóticas y promotoras del crecimiento como CDK2, CDK4, ciclina D1, ciclina D2, lo cual resulta en la muerte de las células tumorales^{23, 25, 41}.

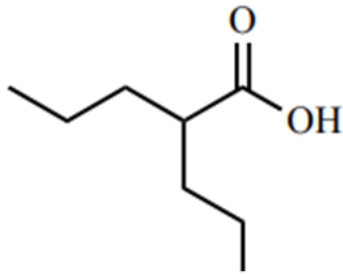
También se ha observado que los iHDACs son capaces de regular la acetilación de proteínas no histonas como p53, HiF-1alpha, pRb, STAT-3, involucradas en el crecimiento y la supervivencia celular⁴¹.

Otro estudio demostró que el tratamiento con iHDACs aumenta la sensibilidad de células tumorales a agentes citotóxicos *in vitro* como quimioterapia y radioterapia⁴².

Actualmente están siendo evaluados iHDACs como el vorinostat, el valproato de magnesio, benzamidas, romidepsina, berinostat, panobinostat, etinostat, trichostatin A y butirato de sodio, principalmente^{3, 41}.

Valproato de magnesio

El ácido valpróico, representado en la figura 6, es un agente empleado como anticonvulsivo debido a que afecta la función del neurotransmisor GABA al potenciar su actividad inhibitoria². Este fármaco es estable a temperatura ambiente y es altamente soluble en solventes orgánicos. En soluciones acuosas, el ácido valpróico existe en forma de sal ya sea como valproato de magnesio o de sodio, y de esta manera puede distribuirse al organismo y a las células más fácilmente².



Ácido valpróico

Figura 6. Ácido valpróico (modificado de Ganesan et al, 2009)

El valproato de magnesio ha demostrado tener una función como inhibidor de las enzimas HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, de manera directa, y muy potente en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* afectando la expresión de genes supresores de tumor^{2, 25}. Lo que resulta en un efecto antitumoral eficiente por medio de la modulación de múltiples vías como arresto del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, metástasis, diferenciación y senescencia. Sin embargo, estos efectos parecen ser específicos del tipo celular y dependientes de las alteraciones genéticas que presenten⁴².

Los resultados más sobresalientes del valproato de magnesio como agente antitumoral se han observado principalmente, en enfermedades hematológicas, por lo que se ha utilizado en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y del síndrome mielodisplásico con buenos resultados².

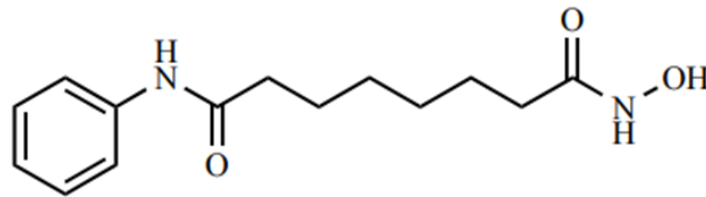
Generalmente, es un fármaco bien tolerado, sin embargo, puede provocar efectos adversos como: mareo, efecto sedante, temblores toxicidad gastrointestinal, falla hepática, teratogenicidad, mielosupresión y fatiga^{2, 25}.

Vorinostat (SAHA)

El vorinostat o ácido suberoilánilido hidroxámico (SAHA por sus siglas en inglés) (figura 7) es un fármaco inhibidor de múltiples clases de enzimas HDACs. Principalmente, inhibe la actividad de las enzimas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 al unirse al sitio activo de las enzimas y quelar el zinc localizado en su sitio activo.

Asimismo, se ha demostrado que inhibe las enzimas HDACs selectivamente de células malignas en comparación con células sanas¹.

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento induce la reexpresión de genes importantes en el control del ciclo celular como p21 induciendo arresto celular y bloqueo de la proliferación celular *in vitro*, en especial en células linfoides¹.



Vorinostat

Figura 7. Vorinostat (modificado de Ganesan et al, 2009)

También se ha observado que el tratamiento con vorinostat induce la hiperacetilación de otras proteínas no histonas como p53, hsp90, α -tubulina y promover la apoptosis en varias líneas celulares humanas de cáncer por medio de la vía intrínseca al inducir el rompimiento de Bid^{3, 40}. El vorinostat fue uno de los primeros iHDACs aprobado para su uso en el linfoma cutáneo de células T, sin embargo, puede provocar algunos efectos secundarios como: diarrea, fatiga, náuseas, trombocitopenia, anorexia, entre otros¹.

ANTECEDENTES

El uso de los inhibidores de HDACs y DNMTs ha demostrado ser efectivo como terapia epigenética antitumoral debido a que la combinación de ambos inhibidores favorece una cromatina más abierta y activa transcripcionalmente para los genes supresores de tumor³⁵, por lo que se ha sugerido que podría existir un efecto sinérgico entre ellos⁴¹. De hecho, la aplicación clínica de la combinación de ambos agentes presenta beneficios en comparación con la monoterapia en el tratamiento contra el cáncer²⁵.

Algunos de los beneficios de la combinación de los inhibidores de HDACs y DNMTs en el tratamiento contra el cáncer son los siguientes: aumento en apoptosis de las líneas celulares malignas, inducción de diferenciación celular, aumento en la expresión de genes específicos, como p21 y los genes pre-caspasa 3 y 8³.

Dicho lo anterior, se ha encontrado evidencia de que la terapia epigenética reduce la quimioresistencia a los fármacos antitumorales clásicos e incluso podría tener una interacción sinérgica con la quimioterapia convencional¹⁵.

Interesantemente, estudios *in vitro* han demostrado que la combinación con hidralazina y valproato de magnesio tiene un efecto sobre la reactivación de genes de manera global al disminuir la metilación global del ADN y la actividad de HDACs^{42, 43}.

Por otra parte, otro estudio demostró que el tratamiento con la combinación decitabina y ácido valpróico disminuye la metilación global del ADN e incrementa la acetilación de histonas en pacientes con leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico. Según el estudio, se demostró que el tratamiento era seguro y con una actividad clínica significativa⁴⁴.

Además, se observó que la combinación con decitabina y vorinostat tiene un efecto significativo en la inhibición del crecimiento celular en una línea celular de cáncer de pulmón después del pre-tratamiento con decitabina⁴⁵.

Con respecto a la terapia epigenética de la combinación de hidralazina con valproato de magnesio, un estudio reciente reportó que el tratamiento fue capaz de revertir la resistencia a quimioterapia en pacientes refractarios con tumores sólidos independientemente del tipo de tumor⁴⁶. Igualmente, un estudio demostró un incremento en la citotoxicidad de gemcitabina, cisplatino y adriamicina en células tumorales al emplear la terapia combinada de hidralazina y valproato de magnesio. Así mismo, se reportó un efecto antitumoral con adriamicina en un modelo xenogénico después del tratamiento con hidralazina y valproato⁴².

Otro estudio expuso un caso clínico de micosis fungoide donde se observó que el tratamiento con hidralazina y valproato de magnesio resultó en una respuesta terapéutica más rápida en comparación con el tratamiento solo con vorinostat (de 3.6 a 21.9 semanas). Lo que sugiere que la adición de un iHDACs e iDNMTs a la terapia convencional podría ser ventajoso porque facilita la reactivación de genes supresores de tumor silenciados por mecanismos epigenéticos⁴³.

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento con un agente desmetilante del ADN como la decitabina, y un inhibidor de desacetilasas de histonas como vorinostat, ha demostrado tener un efecto antitumoral en linfoma cutáneo de células T, leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico y cáncer de pulmón.

Por otra parte, la hidralazina y el valproato de magnesio son fármacos ampliamente usados en enfermedades cardiovasculares y neurológicas que recientemente, han demostrado efectos antineoplásicos cuando son usadas en combinación. Interesantemente, también demostraron la capacidad de inducir la reexpresión de algunos genes supresores de tumor principalmente, en células de cáncer de mama y colon³⁸.

Por lo que el uso de hidralazina, un agente desmetilante del ADN en combinación con valproato de magnesio, un iHDACs, podría tener un efecto antitumoral en un modelo de linfoma cutáneo de células T, debido a que la combinación de estos

agentes como antineoplásicos ha sido ampliamente descrita en otros tipos de cáncer.

HIPÓTESIS

La combinación de hidralazina y valproato de magnesio tiene un efecto citotóxico en una línea celular de linfoma cutáneo de células T y muestran mayor sinergia en comparación a decitabina y vorinostat.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto citotóxico del tratamiento con hidralazina y valproato en una línea tumoral de linfoma cutáneo de células T y compararlo con el tratamiento con vorinostat y decitabina.

Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto individual de hidralazina, valproato, vorinostat y decitabina sobre la viabilidad de la línea de linfoma cutáneo de células T.
2. Determinar la CI_{20-50} de los fármacos hidralazina, valproato de magnesio, vorinostat y decitabina en la línea de linfoma cutáneo de células T.
3. Analizar el efecto y la interacción farmacológica de la combinación hidralazina con valproato versus vorinostat con decitabina en la línea de linfoma cutáneo de células T.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y cultivo celular

Se empleó la línea celular HuT 78, adquirida de American Type Culture Collection, la cual proviene de los linfocitos T cutáneos obtenidos de un paciente con Síndrome de Sézary. Esta línea celular crece en suspensión y se cultiva en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomycin y 2.5 mg/ml anfotericina B. Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

Determinación de la viabilidad celular

Se realizaron las curvas de viabilidad celular en cajas de 12 pozos en donde se sembraron 5×10^4 células HuT 78 en 1 mL de medio, a las 24 h se inició el tratamiento durante 72 h, ya sea con hidralazina, (Sigma, St. Louis, MO, USA), valproato de magnesio (Psicofarma, México), vorinostat (Sigma, St. Louis, MO, USA), o decitabina (Sigma, St. Louis, MO, USA) a dosis graduales, cambiando el medio con fármaco cada 24 h. Para ello se recolectó el contenido de cada pozo y se centrifugó a 120 g por 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio fresco con fármaco. Los fármacos se disolvieron en agua, a excepción del vorinostat que fue disuelto en etanol absoluto. Al finalizar los tratamientos se recolectaron las células en 1 mL de medio fresco para evaluar la viabilidad celular con el colorante de exclusión azul de tripano al 0.4%, empleando una mezcla isovolumétrica de azul de tripano y suspensión celular. Las mediciones se realizaron en un contador automático T10 Automated Cell Counter (145-010), BioRad.

El efecto en la viabilidad celular se expresó como curvas de dosis-respuesta a diferentes concentraciones para cada droga utilizando el software SigmaPlot 10.0. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento y los valores de CI₂₀ – CI₅₀ (concentración inhibitoria de cada fármaco para alcanzar el 20-50% de inhibición del crecimiento).

Análisis de la combinación de fármacos.

Para el análisis de la interacción farmacológica las células fueron tratadas con hidralazina en diferentes dosis (CI₂₀, CI₃₀, CI₄₀, CI₅₀) en combinación con dosis crecientes de valproato de magnesio (CI₂₀, CI₃₀, CI₄₀, CI₅₀). Por otra parte, se realizaron tratamientos con vorinostat y decitabina con las dosis correspondientes (CI₂₀, CI₃₀, CI₄₀, CI₅₀). Se realizaron curvas de viabilidad con las combinaciones resultantes para hidralazina y valproato (HV CI₂₀, HV CI₃₀, HV CI₄₀, HV CI₅₀) y para vorinostat y decitabina (VD CI₂₀, VD CI₃₀, VD CI₄₀, VD CI₅₀). Las células se colocaron en placas de 12 pozos con una concentración de 5x10⁴ células/pozo con 1 mL de medio completo y fueron tratadas durante 72 h con las diferentes combinaciones de hidralazina con valproato y vorinostat con decitabina. Posteriormente, se recuperaron los pellets en 1 mL de medio fresco para evaluar la viabilidad celular por medio del colorante de exclusión azul de tripano.

Evaluación de sinergismo.

Con las curvas de viabilidad obtenidas con las diferentes combinaciones de hidralazina con valproato y vorinostat con decitabina se determinó el “Índice de Combinación” (IC) mediante la fórmula matemática de Chou y Talalay con ayuda del software SigmaPlot

La IC es una representación de la interacción farmacológica utilizando la siguiente ecuación:

$$IC_x = (D_1/D_{x1}) + (D_2/D_{x2}) + \alpha(D_1 \cdot D_2)/(D_{x1} \cdot D_{x2}).$$

Donde IC_x representa el valor de IC, D_{x1} y D_{x2} representan las dosis de los fármacos hidralazina y valproato de magnesio requeridas de manera individual para ejercer un efecto en la viabilidad celular, D₁ y D₂ representan las dosis de hidralazina y valproato de magnesio que inducen el mismo efecto sobre la viabilidad celular en combinación. La variable “α” indica el tipo de interacción entre los fármacos: cuando α=0, los fármacos tienen el mismo mecanismo de acción, cuando α=1 los fármacos tienen un mecanismo de acción diferente. En este caso se utilizó

la variable $\alpha=1$. Cuando $IC=1$ el efecto es aditivo, cuando el $IC < 1$ es sinergismo y cuando el $IC > 1$ es antagonismo.

Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresan como el promedio \pm SD. El nivel de significancia estadística se evaluó mediante análisis de ANOVA con la corrección Tukey.

RESULTADOS

Efecto del tratamiento con hidralazina, valproato de magnesio, decitabina y vorinostat sobre la viabilidad de las células Hut78 de linfoma cutáneo de células T.

Las células fueron tratadas por 72 h con cada uno de los fármacos, realizando cambio de medio con fármaco diariamente para determinar el efecto de los fármacos hidralazina, valproato de magnesio, decitabina y vorinostat sobre la viabilidad de las células HuT 78 mediante el colorante de exclusión azul de tripano.

Como se puede observar en la figura 8, la viabilidad de las células Hut 78, de linfoma cutáneo de células T disminuye con del tratamiento de hidralazina de manera dosis dependiente, con respecto a las células sin tratamiento, de manera significativa.

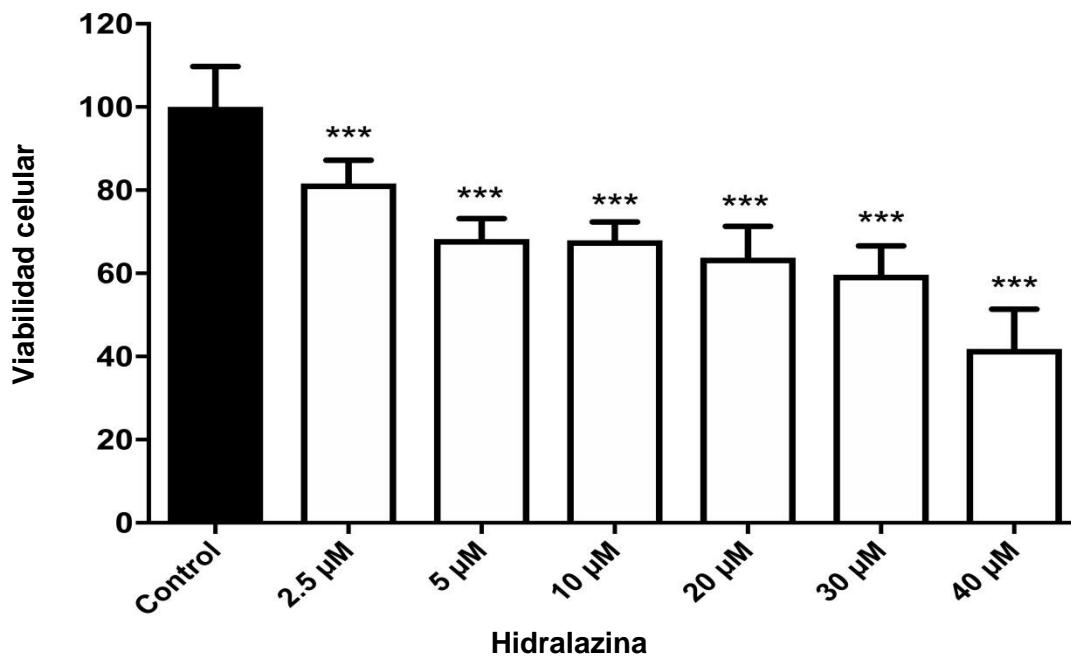


Figura 8. Efecto en la viabilidad celular en la línea celular HuT 78 tratada con hidralazina. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de hidralazina (2.5, 5, 10, 20, 30 y 40 µM) e incubadas en placas de 12 pozos por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 horas ***p<0.001,

A continuación, se determinó el efecto del valproato de magnesio sobre la viabilidad de las células HuT 78 de linfoma cutáneo de células T (figura 9). Como resultado de la exposición al fármaco, se muestra una disminución en la viabilidad celular a partir

de la dosis más baja de 0.125 mM con diferencias significativas al con respecto al control.

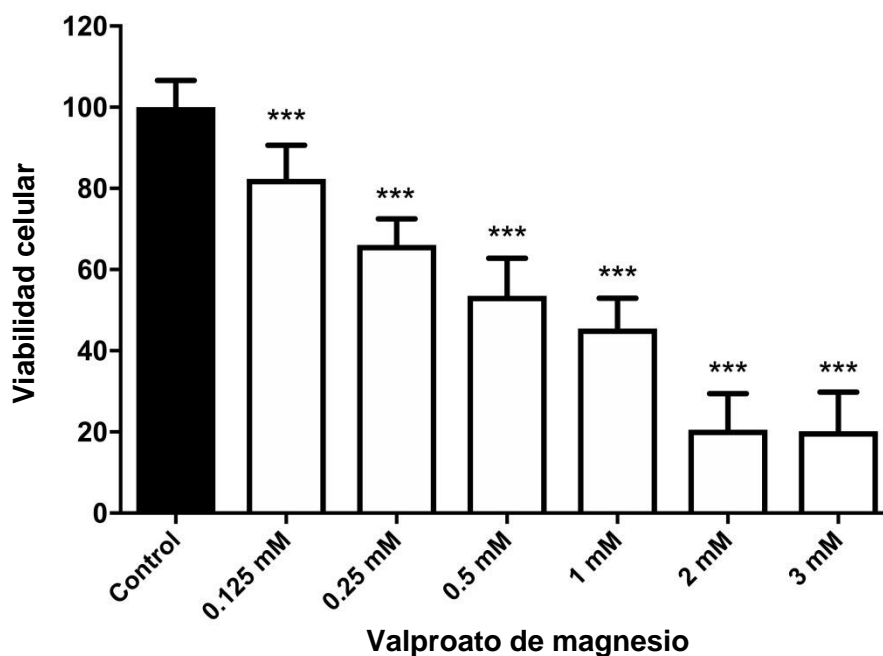


Figura 9. Efecto en la viabilidad celular en la línea celular HuT 78 tratada con valproato de magnesio. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de valproato de magnesio (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, y 3 mM) e incubadas en placas de 12 pozos por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 horas. *** $p < 0.001$.

Posteriormente, se analizó el efecto del tratamiento con decitabina, otro agente desmetilante, en células HuT 78 de linfoma cutáneo de células T. Los resultados demostraron una disminución significativa de la viabilidad celular de manera dosis dependiente y en forma significativa a partir de la segunda dosis que fue de 0.25 μM (figura 10).

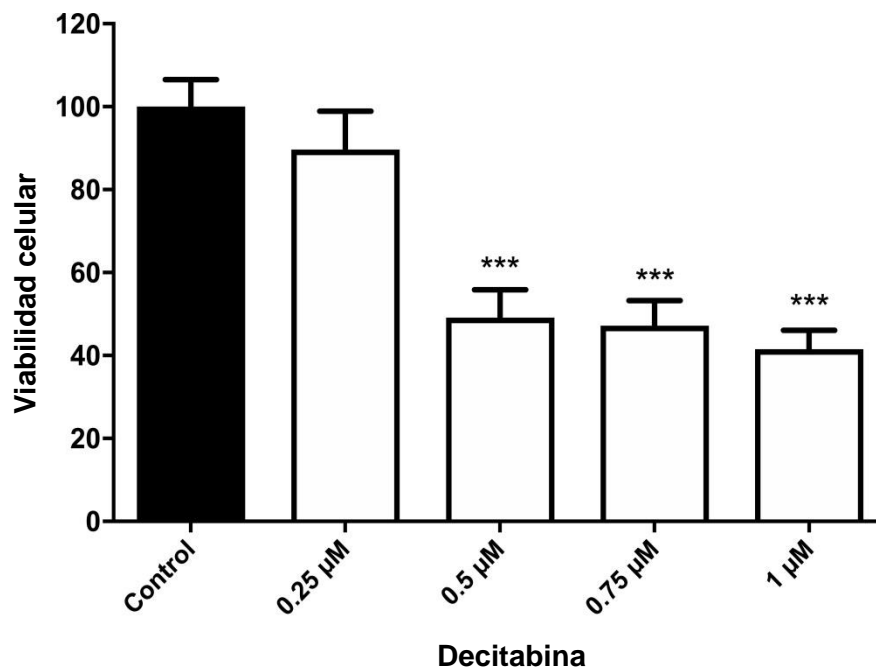


Figura 10. Efecto en la viabilidad celular en la línea celular HuT 78 tratada con decitabina. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de decitabina (0.25, 0.5, 0.75, 1 μM) e incubadas en placas de 12 pozos por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 horas. *** $p < 0.001$.

Finalmente, se investigó el efecto de vorinostat en las células HuT 78 de linfoma cutáneo de células T. Los resultados demostraron una disminución significativa de la viabilidad de las células tratadas a partir de 0.75 μM con respecto a las no tratadas (Figura 11).

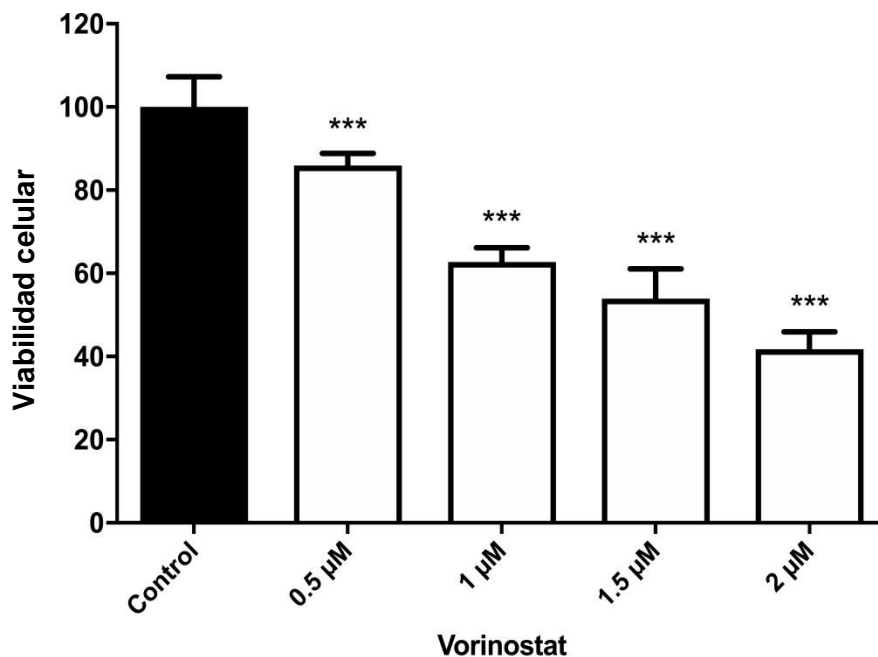


Figura 11. Efecto en la viabilidad celular en la línea celular HuT 78 tratada con vorinostat. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de vorinostat (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 μM) e incubadas en placas de 12 pozos por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 horas. *** $p < 0.001$.

A partir de las curvas dosis respuesta que se obtuvieron con la exposición de las células HUT 78 a los fármacos hidralazina, valproato, decitabina y vorinostat se determinó la CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} , CI_{50} para cada uno de los tratamientos, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la determinación de CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} , CI_{50} de hidralazina, valproato de magnesio, decitabina y vorinostat con ayuda del software SigmaPlot.

Fármaco	CI_{20} (μM)	CI_{30} (μM)	CI_{40} (μM)	CI_{50} (μM)
Hidralazina	1.7	6.2	14.97	29.95
Valproato de magnesio	140	220	330	450
Decitabina	0.3	0.34	0.39	0.49
Vorinostat	0.52	0.83	1.16	1.48

Efecto del tratamiento con la combinación hidralazina y valproato de magnesio sobre la viabilidad de las células Hut 78 de linfoma cutáneo de células T.

Una vez determinado el efecto de cada fármaco sobre la viabilidad de las células HuT 78, se continuó a investigar el resultado que podría tener la combinación de hidralazina y valproato de magnesio, de igual manera, sobre la viabilidad celular de dichas células, con diferentes concentraciones manteniendo una proporción constante entre ambos fármacos. Como se muestra en la figura 12, el tratamiento con la combinación de hidralazina y valproato de magnesio induce una reducción en la viabilidad celular con respecto al control a partir de la combinación de la CI_{20} , de cada fármaco, de manera significativa.

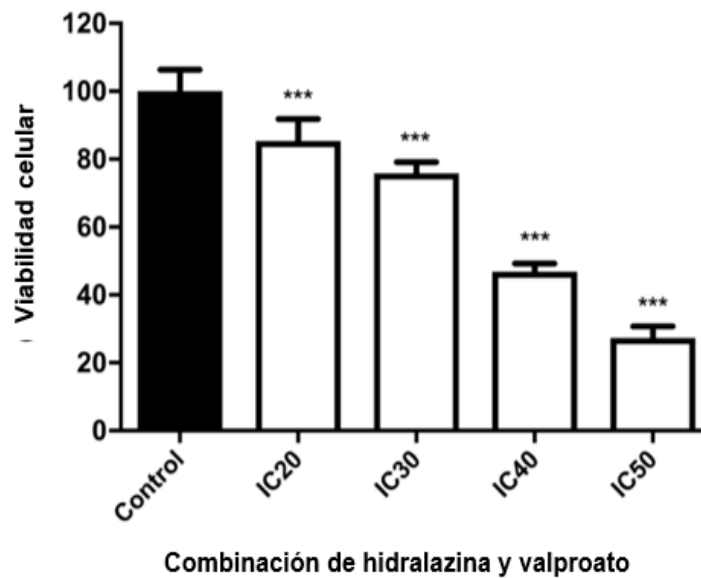


Figura 12. Efecto en la viabilidad celular en la línea celular HuT 78 tratada con la combinación de hidralazina y valproato de magnesio. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de hidralazina y valproato de magnesio (CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} , CI_{50}) e incubadas en cajas de 12 pozos por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 h. *** $p < 0.001$

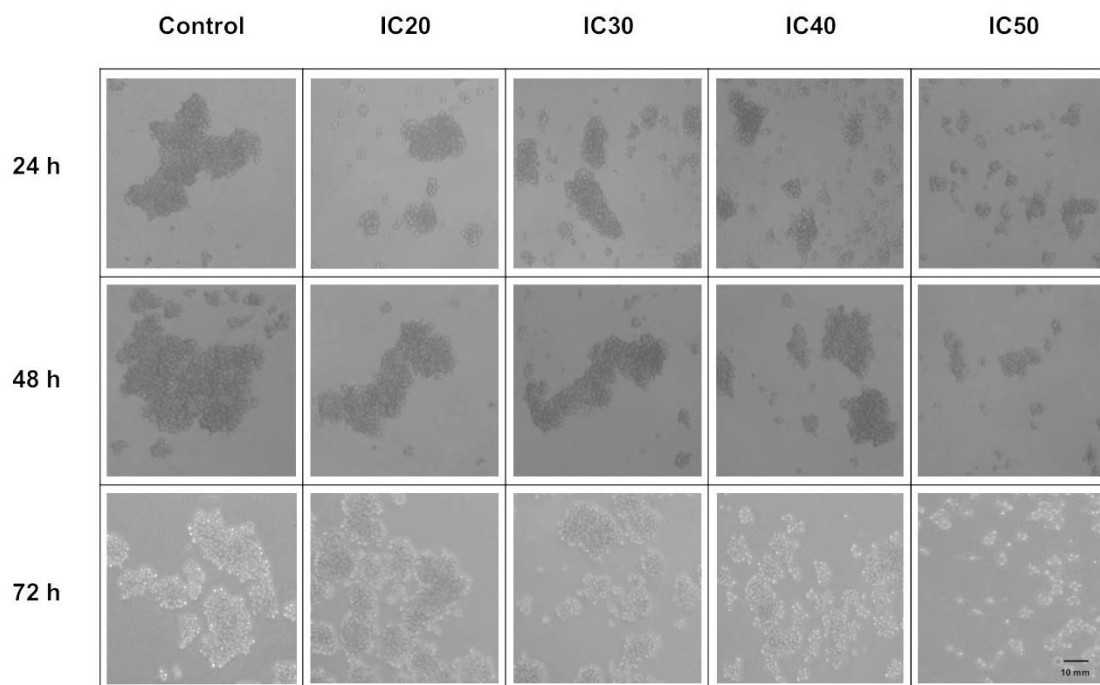


Figura 13. Cultivo celular de la línea celular HuT 78 tratada con la combinación de hidralazina y valproato de magnesio. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de hidralazina y valproato de magnesio (IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀, IC₅₀) e incubadas por 24, 48 y 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 h.

En la figura 13 se puede apreciar de manera visual la reducción en la viabilidad de las células HuT 78 con el tratamiento de la combinación de hidralazina con valproato de magnesio en diferentes concentraciones.

A continuación, se analizó el tipo de interacción farmacológica utilizando el software SigmaPlot. La figura 14 muestra el índice de combinación (IC) obtenido con los datos de la curva dosis-respuesta para cada una de las combinaciones anteriormente mencionadas, Cuando los valores de IC son mayores a 1 indican antagonismo, cuando son menores a 1 indican sinergismo y los valores de IC iguales a 1 indican un efecto aditivo. Por su parte, la combinación de hidralazina y valproato a una IC₄₀ e IC₅₀ demuestran una interacción de tipo sinérgica, al contrario de las IC₂₀ e IC₃₀ que reflejan una interacción antagónica.

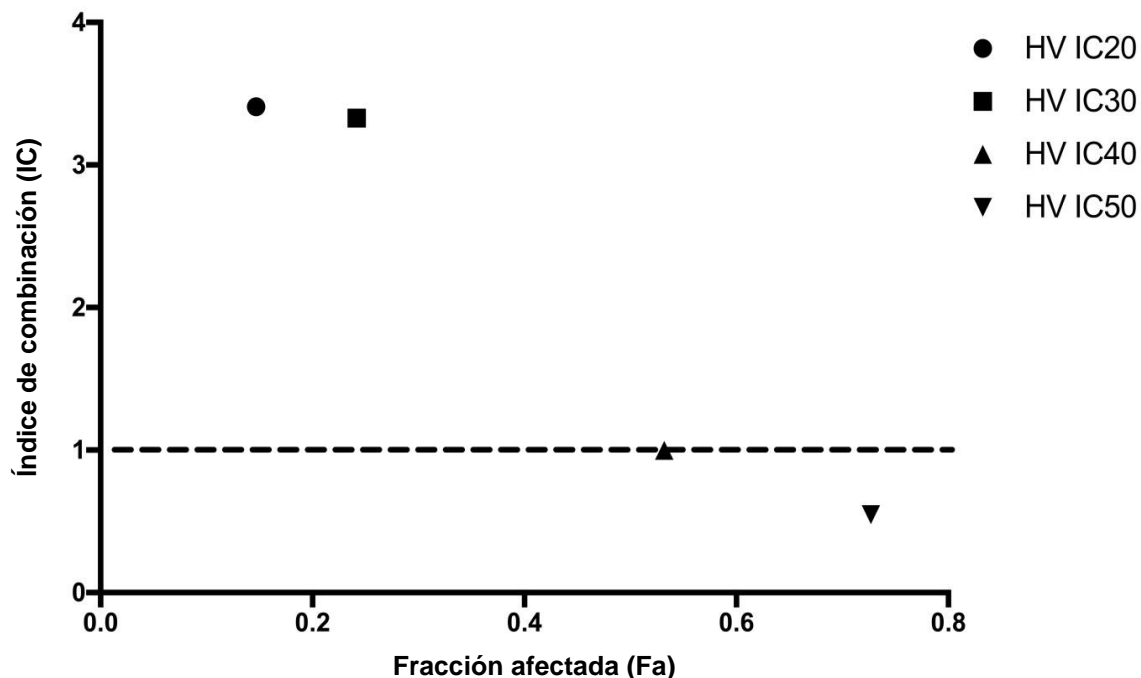


Figura 14. Índice de combinación de hidralazina y valproato de magnesio en las células HuT 78. Los valores de IC mayores a 1 indican antagonismo, los valores de IC menores a 1 indican sinergismo y los valores de IC iguales a 1 indican un efecto aditivo. Fracción afectada indica la inhibición fraccional de la viabilidad para cada combinación.

Como se muestra en la Tabla 4 los resultados demostraron que el tipo de interacción para la combinación de hidralazina y valproato de magnesio a bajas dosis fue de tipo antagonista debido a que los valores obtenidos fueron mayores a 1. No obstante, para las concentraciones más altas de los fármacos el valor del IC fue menor a 1, lo que indica una interacción sinérgica.

Tabla 4. Resultados del análisis farmacológico de la combinación de hidralazina y valproato de magnesio con ayuda del software SigmaPlot (HV= Hidralazina y valproato de magnesio)

Combinación	Fracción afectada (Fa)	Índice de combinación (IC)
HV CI20	0.146746	3.408
HV CI30	0.241617	3.329
HV CI40	0.531805	0.999
HV CI50	0.726923	0.548

Para continuar con la investigación de los efectos sobre viabilidad de las células HuT 78 con la terapia combinatoria de un agente desmetilante del ADN y un fármaco para la desacetilación de histonas, se realizó la exposición de dichas células a la combinación de decitabina y vorinostat, en relación a sus concentraciones inhibitorias CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} Y CI_{50} , como se realizó previamente para la hidralazina y valproato de magnesio. A continuación, se presentan los resultados en la figura 15.

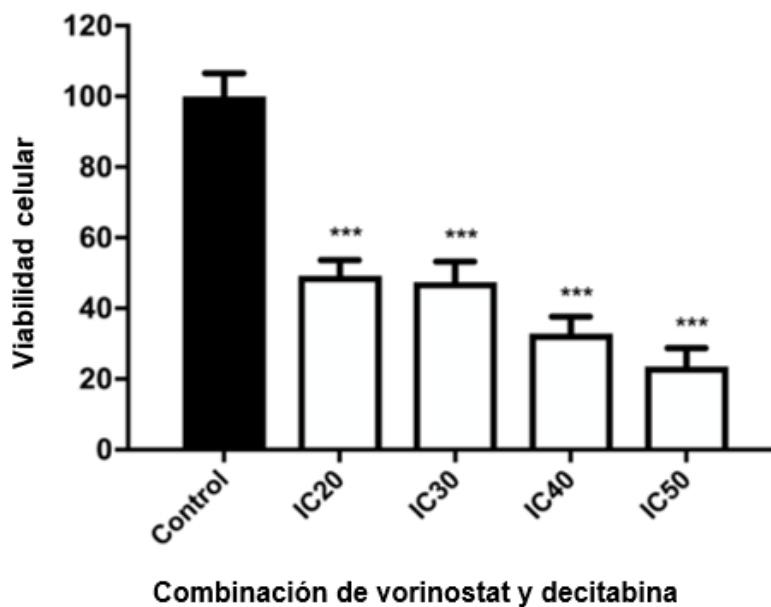


Figura 15. Efecto del tratamiento con la combinación de decitabina y vorinostat en las células HuT 78 durante 72 h. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de decitabina y vorinostat (CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} , CI_{50}) e incubadas en cajas de 12 pozos por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 h. *** $p < 0.001$

En la figura 16 se puede apreciar de manera visual la reducción en la viabilidad de las células HuT 78 con el tratamiento de la combinación de decitabina y vorinostat en diferentes concentraciones.

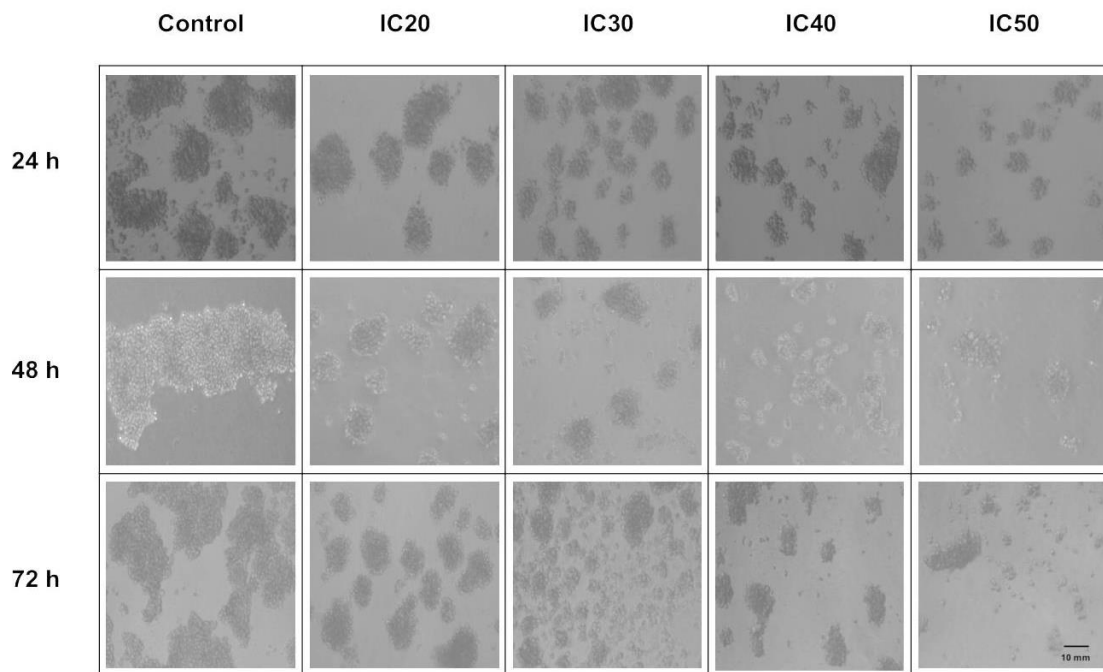


Figura 16. Cultivo celular de la línea celular HuT 78 tratadas con la combinación de decitabina y vorinostat durante 72 h. Las células HuT 78 fueron tratadas con diferentes concentraciones de decitabina y vorinostat (IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀, IC₅₀) e incubadas por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 h.

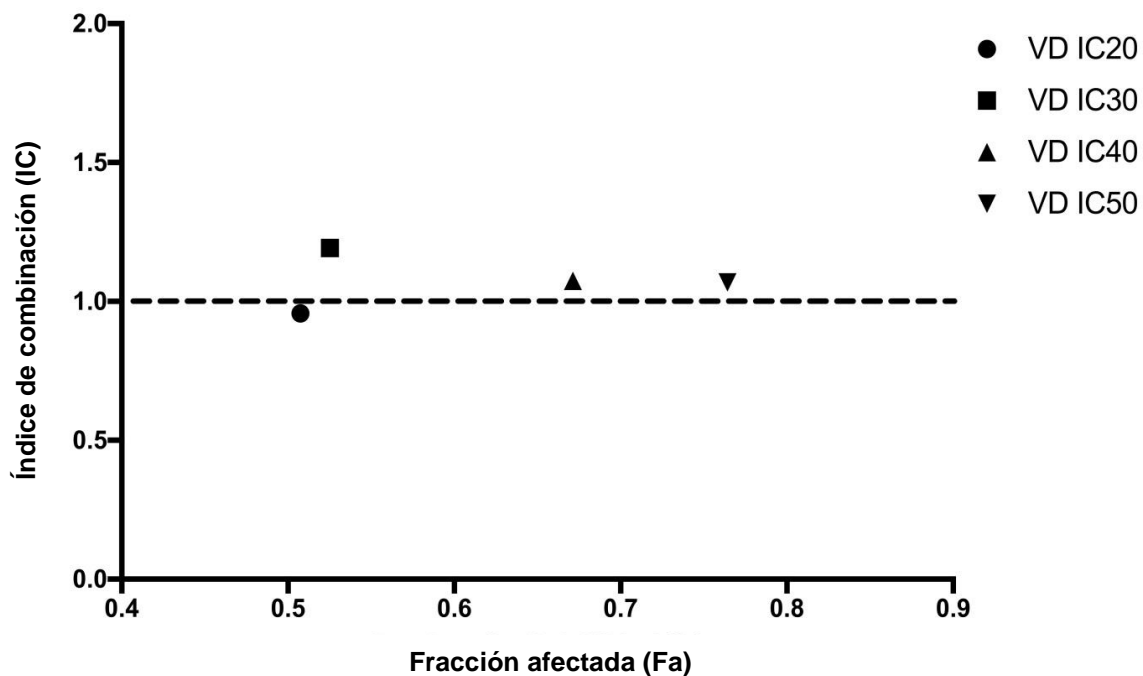


Figura 17. Índice de combinación de decitabina y vorinostat en las células HuT 78. (IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀, IC₅₀) e incubadas en cajas de 12 pozos por 72 h, realizando cambio de medio con fármaco cada 24 horas.

Tabla 5. Resultados del análisis farmacológico de la combinación de decitabina y vorinostat de magnesio con ayuda del software SigmaPlot (VD= Vorinostat y decitabina).

Combinación	Fracción afectada (Fa)	Índice de combinación (CI)
VD IC20	0.507458	0.957
VD IC30	0.525263	1.192
VD IC40	0.671353	1.074
VD IC50	0.76435	1.069

Así mismo se realizó el análisis de la interacción farmacológica entre la decitabina y el vorinostat, encontrándose un efecto antagonista para las combinaciones del IC₃₀, IC₄₀ e IC₅₀, solamente para la combinación del IC₂₀ se encontró una interacción de tipo sinérgica marginal como se demuestra en la figura 17. En la tabla 6 se presentan los resultados de índice de combinación de manera numérica.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los fármacos hidralazina, valproato de magnesio, decitabina, y vorinostat tienen un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células HuT 78 de linfoma cutáneo de células T de manera dosis dependiente. Estos resultados concuerdan con un reporte previo en el que se demuestra el efecto del vorinostat en la inducción de apoptosis de las células HuT 78, así como la modulación de la expresión de proteínas involucradas en dicho proceso como: p21, bax, Stat6 y caspasa³⁴⁷.

Por otra parte, se observó que el efecto del vorinostat para inhibir la sobre la viabilidad celular fue mayor en comparación con el tratamiento con valproato de magnesio aun cuando ambos fármacos tienen un mecanismo de acción similar, al inhibir las enzimas HDAC1, HDAC2 y HDAC3¹.

Con base en las CI_{50} , de cada fármaco podríamos inferir que las células HuT 78 fueron mucho más sensibles al tratamiento con decitabina, un inhibidor de las enzimas catalizadoras de la metilación del DNA, que con el tratamiento con hidralazina, vorinostat y valproato de magnesio. Nuestros resultados concuerdan con reportes en donde se ha demostrado que la decitabina es uno de los fármacos más eficientes para el tratamiento del síndrome mielodisplásico y para algunos tipos de cánceres hematológicos^{5, 25}.

Según el estudio de los efectos en la viabilidad celular, la hidralazina muestra un efecto inhibitorio significativo sobre la línea celular HuT 78 de linfoma cutáneo de células T de manera dosis dependiente, el cual no había sido reportado en ninguna otra línea tumoral con el tratamiento individualizado³⁸. Es por ello que es necesario realizar más ensayos con este tipo de inhibidor de DNMTs en otros tipos de linfoma, con el fin de analizar su efecto como agente antitumoral, y teniendo la ventaja de provocar menos efectos secundarios en pacientes con cáncer que la decitabina³⁸.

Por otra parte, en el 2006 se reportó un caso clínico en el cual un paciente con micosis fungoide fue tratado con la combinación de hidralazina y valproato de magnesio, donde se observó un rango de respuesta más efectivo en comparación con vorinostat⁴³. Con el fin de tratar de dilucidar la respuesta a la terapia combinada, en este trabajo se analizó su efecto *in vitro* en la línea celular HuT 78 de linfoma cutáneo de células T, encontrándose una inhibición del crecimiento celular a partir de la combinación de hidralazina y valproato a sus concentraciones inhibitorias 20. Este resultado concuerda con el efecto de los fármacos individualmente.

Si bien es cierto que los resultados arrojan un efecto antagonista sobre la viabilidad de las células HuT 78 cuando se utilizaron las concentraciones inhibitorias más bajas tanto de hidralazina y valproato de magnesio, es decir la CI_{20} y CI_{30} , en las combinaciones con las CI_{40} y CI_{50} sí se produjo un efecto sinérgico. Esto podría deberse a que al realizar las combinaciones aun manteniendo las proporciones constantes entre ellos estas fueron muy bajas o fueron demasiadas variables, lo que pudo inhibir el efecto de un fármaco sobre otro, pues de manera individualizada los efectos fueron significativos. La eficacia del tratamiento sobre la disminución de

la viabilidad celular podría depender de que los fármacos en combinación alcancen concentraciones mayores a CI_{30} .

Se ha reportado que la hidralazina y el valproato de magnesio han sido utilizados como fármacos antihipertensivo y anticonvulsivo respectivamente. Sin embargo, a partir de los estudios de reposicionamiento farmacéutico se han utilizado como terapia epigenética adyuvante en el tratamiento de algunos tipos de cáncer^{42, 48} al actuar como un inhibidor de las DNMT, en el caso de la hidralazina y como un inhibidor de HDAC, en el caso del valproato de magnesio. En dichos estudios se ha demostrado que estos fármacos, en combinación, permiten el restablecimiento de los patrones de expresión genéticos normales en las células cancerígenas, muy probablemente, al revertir las modificaciones epigenéticas aberrantes y debido a un efecto sinérgico sobre la expresión global de genes al reactivar genes supresores de tumores⁴².

Con base en estos resultados, es necesario realizar ensayos adicionales para conocer el efecto de la combinación hidralazina y valproato de magnesio *in vivo* en panel de líneas tumorales de linfoma y determinar si el efecto es dependiente del tipo celular.

CONCLUSIONES

La hidralazina y valproato de magnesio demostraron un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células HuT 78 de linfoma cutáneo de células T, así como los fármacos decitabina y vorinostat. Sin embargo, el análisis de la Interacción farmacológica de la combinación de hidralazina y valproato de magnesio demostró una interacción de tipo sinérgica al combinar las concentraciones inhibitorias 40 y 50 mientras que la sinergia no fue observada con decitabina y vorinostat dos fármacos establecidos como terapia epigenética para el síndrome mielodisplásico y linfoma cutáneo de células T respectivamente.

El reposicionamiento farmacológico de la combinación con hidralazina y valproato de magnesio disminuye en forma significativa la viabilidad de una línea celular de

linfoma cutáneo sugiriendo que las estrategias de terapia epigenética podrían ser visualizadas para ser evaluadas en estudios preclínicos y abre un nuevo panorama para la terapia epigenética en linfoma cutáneo de células T, como agentes antineoplásicos. Además de tener como ventaja el hecho de que puede ser administrada de manera oral, lo cual es una gran ventaja en comparación con otras terapias epigenéticas que ya son usadas para este tipo de cáncer.

REFERENCIAS

1. Mummaneni P, Shord S (2014). Epigenetics and Oncology. *Pharmacotherapy* **35(4)**: 495-505.
2. Dueñas-González A, et al (2008). Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treatment Reviews* **34**: 206–222.
3. Zhu W, Otterson G (2003). The interaction of histone deacetylase inhibitors and ADN methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr. Med. Chem- Anti-Cancer Agents* **3**: 187-199.
4. Hannah D, Weinberg R (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
5. Vecchio L, et al (2013). Importance of epigenetic changes in cancer etiology, pathogenesis, clinical profiling, and treatment: What can be learned from hematologic malignancies? *Biochimica et Biophysica Acta* **1836**: 90-104.
6. Taylor K, et al (2013). Aberrant epigenetic gene regulation in lymphoid malignancies. *Seminars in Hematology* **50**: 38-47.
7. Klemke, C (2013). Cutaneous lymphoma. *J Dtsch Dermatol Ges* **1**-22.
8. Wilcox R (2017). Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology* **92**: 1085–1102.
9. SSA. 2013. Base de egresos hospitalarios 2012. *Procesó INEGI* **1**-15.
10. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. 2011.
11. Connors J, His E, Foss F (2002). Lymphoma of the skin. *Hematology* **263**-282.
12. Rueda X, Cortés C (2008). Linfomas cutáneos. *Rev Asoc Col Dermatol* **16**: 143-158.
13. Scarisbrick J, et al (2014). Prognostic factors, prognostic indices and staging in mycosis fungoides and Sézary syndrome: where are we now? *British Journal of Dermatology* **170**: 1226–1236.

14. Qin J-Z, Dumer R, et al (1999). Constitutive and Interleukin-7/Interleukin-15 Stimulated ADN Binding of Myc, Jun, and Novel Myc-Like Proteins in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells. *Blood* **93**: 260-267.
15. Girardi M, Heald P, Lynn D (2004). The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med* **350**:1978-1988.
16. Kim E, et al (2005). Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation* **115**: 798-812.
17. Piekarz R., et al (2004). T-cell lymphoma as a model for the use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: impact of depsipeptide on molecular markers, therapeutic targets, and mechanisms of resistance. *Blood* **103**: 4636-4643.
18. Elenitoba-Johnson K, Wilcox R (2016). A new molecular paradigm in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1-33.
19. van Doorn R, et al (2005) Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma: promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73. *JouARNI of clinical oncology* **23(17)**: 3886-3896.
20. Dawson M, Kouzarides T (2012). Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell* 12-27.
21. Hattori N, Ushijima T (2014). Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 445: 3-9.
22. Saleem M, et al (2015). Review-Epigenetic therapy for cancer. *Pak J Pharm Sci.* **28(3)**: 1023-32.
22. Butler J, Dent S (2013). The role of chromatin modifiers in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* **121(16)**: 3076-3084.
23. Fong C, Morison J, Dawson M (2014). Epigenetic in the hematologic malignancies. *Haematologica* **99**: 1772-1783.
24. Zain J, O'Connor O (2010). Targeting histone deacetylases in the treatment of B- and T-cell malignancies. *Invest New Drugs* **28** (Suppl 1):S58–S78.

25. Ganesan A, et al (2009). Epigenetic Therapy: Histone Acetylation, ADN Methylation and Anti-Cancer Drug Discovery. *Current Cancer Drug Targets* **9**: 963-981.
26. Wongtrakoongate P (2015). Epigenetic therapy of cancer stem and progenitor cells by targeting ADN methylation machineries. *World Journal of Stem Cells* **7(1)**: 137-148.
27. Jeltsch A, Jurkowska R (2014). New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences*. **39(7)**: 310-318.
28. Subramaniam D, et al (2014). ADN methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol.* **1**: 4-80.
29. Zhang W, Xu J. (2017). ADN methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark Res.* **20**: 5-10.
30. Li Y, Seto E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **3**: 6 -10.
31. Ricketts M, et al (2018). Molecular basis for chromatin assembly and modification by multi-protein complexes. *Protein Science* 1-32.
32. Ropero S, Esteller M (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol.* **1(1)**:19-25.
33. Sahakian E, et al (2017).Essential role for histone deacetylase 11(HDAC11) in neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology.* **102**: 1-12.
34. Chen HP, Zhao YT, Zhao TC (2015). Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression. *Crit Rev Oncog* **20(1-2)**: 35-47.
35. Keqin K, et al (2013). ADN Methyltransferases in hematologic malignancies. *Seminars in hematology* **50(1)**: 48-60.
36. Yang, X, et al. (2010). Targeting ADN Methylation for Epigenetic Therapy. *Trends Pharmacol Sci* **31**: 536-546.
37. Zambrano P, et al (2009). A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer.* **29**: 5-44
38. Singh V, Sharma P, Capalash N (2013). ADN methyltransferase-1 inhibitor as epigenetic therapy for cancer. *Current cancer drug targets* **13**: 379-399.

39. Dokmanovic M, Clarke C, Marks P (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular cancer research* **5**: 981-989.
40. Sakajiri S, et al (2005). Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Experimental Hematology* **33**: 53-61.
41. Piekarcz R, Bates S (2009). Epigenetic modifiers: basic understanding and clinical development. *Clinical cancer research* **15**: 3918-3926.
42. Chavez-Blanco A, et al (2006). Antineoplastic effects of the ADN methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines *Cancer cell international* **6**: 1-9.
43. Dueñas-Gonzalez A, et al (2010). Response to hydralazine-valproate in a patient with mycosis fungoides. *Case reports in medicine* **2010**: 1-4.
44. Soriano AO (2007). Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* **110 (7)**: 2302-2308.
45. Fujimoto J, et al (2010). Validation of a Novel Statistical Model for Assessing the Synergy of Combined-agent Cancer Chemoprevention. *Cancer Prev Res.* **3(8)**: 917–928.
46. Candelaria M, et al (2007). A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Annals of Oncology* **18(9)**: 1529–1538.
47. Zhang C, et al (2006). Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic Action. *Journal of investigative dermatology* **125**:1045 –1052.
48. De la Cruz E, et al (2011). Transcriptional changes induced by epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate in cervical carcinoma. *Oncology reports* **25**: 399-407.