



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**ROL DE HDAC6 EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR
PD-L1 Y FUNCIONALIDAD DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN STAT3 EN CÉLULAS DE CÁNCER
COLORRECTAL**

POR CAMILA FERNANDA NAVARRETE MUÑOZ

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico.

Patrocinante: Dra. Roxana Pincheira
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción.

Profesor guía: Dr. Matías Hepp
Departamento de Ciencias Básicas
y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la
Santísima Concepción.

Julio 2021

Concepción, Chile

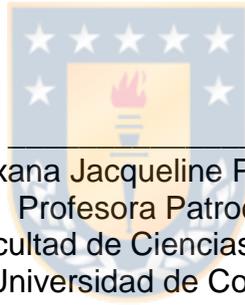
Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Matías Ignacio Hepp Castro.
Profesor Guía.
Facultad de Medicina.
Universidad Católica de la Santísima Concepción



Dra. Roxana Jacqueline Pincheira Barrera.
Profesora Patrocinante.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Profesor Evaluador.
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.
Universidad de Concepción.

Dr. Gonzalo Muñoz Leiva.
Profesor Evaluador.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

AGRADECIMIENTOS

Agradecida de mi familia por todo el apoyo brindado durante mi vida universitaria y todos los valores enseñados desde pequeña que me ayudaron a llegar a este punto. A mi hermana Sofía, por ser mi inspiración a ser mejor persona cada día.

A mis amigos de vida, compañeros de carrera y La Comarca y amigos ENZ que me acompañaron en esta etapa, gracias por las alegrías y penas, consejos y largas charlas científicas. Sin duda todos han sido una gran familia Universitaria. Gracias a Manuel que me ha motivado seguir adelante y dar el gran paso a una nueva etapa.



Agradecimientos también al Dr. Matías Hepp Castro, mi tutor, por confiar y creer en mí, por su ayuda, enseñanza y comprensión. A mi compañero de laboratorio que me acompañó en el comienzo de esta etapa y a los miembros del laboratorio y Facultad de Medicina de UCSC donde realicé mi trabajo de tesis.

Finalmente, este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del proyecto DIN Reg 05-2019 UCSC, FONDECYT de iniciación 11190287 y Apoyo a la realización de Tesis 2019 19CTEBI-113084 del Comité de Desarrollo Productivo Regional Biobío – CORFO.

TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN.....	10
2	INTRODUCCIÓN.....	11
2.1	Cáncer.....	11
2.2	Epidemiología del cáncer.....	12
2.3	Cáncer Colorrectal.....	16
2.4	Tratamientos para el cáncer colorrectal.....	18
2.5	Sistema inmune en el cáncer colorrectal.....	20
2.6	Regulación epigenética en Cáncer colorrectal.....	26
2.7	Deacetilasa de Histonas.....	29
2.8	Histona deacetilasa de ubicación citoplasmática: HDAC6.....	34
2.9	STAT3 y PD-L1.....	36
2.10	HDAC6 modula la activación de la vía STAT3.....	41
2.11	HDAC6 controla indirectamente la expresión de PD-L1.....	44
2.12	Inhibidores de HDAC.....	46
3	HIPÓTESIS.....	48
4	OBJETIVOS.....	49
5.1	4.1 Objetivo general:.....	49
5.2	4.2 Objetivos específicos.....	49
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
	Cultivo celular y líneas celulares.....	50
	Inhibidores de Histonas deacetilasas.....	50

	Ensayo de citotoxicidad	51
	Ensayo de apoptosis con Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) y Anexina V.	52
5.3	Aislamiento de ARN y Retrotranscripción	52
5.4	PCR en tiempo real	53
5.5	Partidores para detección de expresión de ARNm y análisis de sitios de unión	54
5.6		
5.7	Obtención de extractos totales de proteína	55
5.8	5.9 Electroforesis de proteínas y Western blot	55
	2.10 Análisis in silico de promotor de PD-L1.	57
	5.11 Optimización de PCR para análisis de sitios de unión.....	57
6	RESULTADOS	59
7	DISCUSIÓN.....	90
8	CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	98
9	GLOSARIO	100
10	BIBLIOGRAFÍA.....	102
11	ANEXO	109

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Incidencia y número de muertes por cáncer a nivel mundial.	14
Figura 2. Incidencia y muerte por cáncer en Chile.....	15
Figura 3. Mecanismo de acción de terapia de bloqueo de puntos de control. ..	22
Figura 4. Puntos de control inmunitario receptor PD-1 y ligando PD-L1	24
Figura 5. Esquema de los dominios de proteína HDAC6.....	33
Figura 6. Expresión de receptor PD-L1 y STAT3.....	40
Figura 7. Activación de factor de transcripción STAT3	43
Figura 8. Modulación de expresión de PD-L1 por HDAC6.....	45
Figura 9: Viabilidad celular luego de tratamiento con inhibidores HDACs	61
Figura 10: Muerte celular por tratamiento con Nexturastat A.....	64
Figura 11: Viabilidad celular luego de tratamiento con Nexturastat A a mayor rango de concentraciones.....	66
Figura 12: Niveles relativos de ARNm de moléculas inmuno-estimuladoras en líneas celulares de colon CCD841 y cáncer colorrectal HCT116 y HT29.	69
Figura 13: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de PD-L1 con Nexturastat A 1uM.	71
Figura 14: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de PD-L1 con Nexturastat A 5uM.	73
Figura 15: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de STAT3 con Nexturastat A 1uM.	75
Figura 16: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de STAT3 con Nexturastat A 5uM.	77
Figura 18: Detección de proteína mediante Western Blot para líneas celulares de cáncer colorrectal.....	82
Figura 19: Alineamiento de región promotora del gen de <i>PD-L1</i> de humano y ratón.....	84

Figura 20: Sitios de unión de factor de transcripción STAT3 en el promotor PD-L1 humano.86

Figura 21: Esquema representativo de oligonucleótidos generados para análisis de sitio de unión de STAT3 en región promotora de PD-L187

Figura 22: Estandarización de oligonucleótidos para sitios de unión a STAT3. 89



INDICE DE TABLAS

Tabla I: Clasificación de Histona deacetilasa de levadura y humana	29
Tabla II: Oligonucleótidos sintetizados para análisis de RT-PCR	54
Tabla III: Oligonucleótidos sintetizados para análisis de sitios de unión.	54



1 RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en Chile y el mundo. Actualmente el cáncer colorrectal es una de las neoplasias con mayor incidencia en nuestro país, siendo además, la quinta causa de muerte en él y la tercera causa de muerte en la Región del Biobío. El cáncer colorrectal se desarrolla gradualmente por alteraciones genéticas y epigenéticas, entre estas, se considera la actividad de Histona Deacetilasa 6 sobre proteínas no histónicas, como es STAT3. El cual, al sufrir ciertas modificaciones modula la expresión del receptor PD-L1, el que actúa como un mecanismo de resistencia inmune. PD-L1 se encuentra expresado en células de cáncer colorrectal. Sin embargo, se desconoce el efecto de la inhibición de HDAC6 en la expresión de este receptor en cáncer colorrectal. En este estudio se sugiere que la inhibición de HDAC6 disminuiría la expresión de PD-L1 en células de cáncer colorrectal sin afectar la expresión de STAT3. Para lo anterior, se evaluó el efecto de la inhibición de HDAC6 en la viabilidad celular, niveles de expresión de PD-L1 Y STAT3, y se analizaron sitios de unión *in silico* para STAT3 en el promotor de PD-L1. Los resultados mostraron que inhibir HDAC6 modula negativamente la expresión de PD-L1 sin afectar la expresión de STAT3, además de inducir apoptosis y disminución de la viabilidad celular en células de cáncer colorrectal, y que STAT3 estaría participando en la expresión de PD-L1 por encontrarse varios sitios de unión a este factor en la región promotora de PD-L1.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo y que posee características comunes que incluyen 1) hiperproliferación celular, 2) evasión de factores supresores de crecimiento, 3) activación de la invasión y metástasis, 4) inmortalidad replicativa, 5) inducción de la angiogénesis y 6) resistencia a la apoptosis. Dentro de los factores desencadenantes están: las mutaciones somáticas, alteraciones en el control de la integridad genómica y replicativa, un microambiente inflamatorio, sobre expresión y/o baja expresión de genes relacionado con la adhesión celular, factores de transcripción, entre otras causales (Hanahan & Weinberg, 2011)

Todos estos factores conllevan a la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales propagándose a otros órganos, en un proceso denominado metástasis (OMS, 2020).

2.2 Epidemiología del cáncer

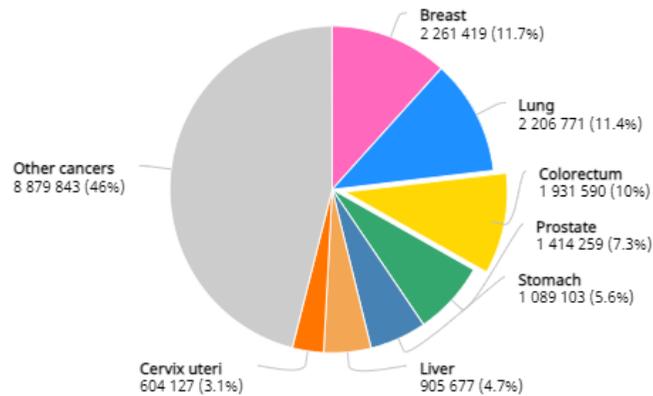
El cáncer es un importante problema de salud pública en todo el mundo (Siegel, Miller, & Jemal, 2017) ya que es la segunda causa de muerte a nivel mundial según el último reporte de la Organización Mundial de la Salud (12 de septiembre de 2018). En la mayoría de los países con un alto índice de desarrollo humano, las tasas de mortalidad por cáncer están disminuyendo, principalmente como resultado de los recientes éxitos en la lucha contra el cáncer mediante intervenciones eficaces de prevención que reducen el riesgo al evitar el consumo de tabaco, sobrepeso, incentivando la actividad física y buena alimentación, una detección temprana reconociendo los síntomas de los tipos de cáncer más comunes y acceso a cribados antes del desarrollo de síntomas, y finalmente tratamientos adecuados, eficaces y oportunos.. En cambio, en los países en transición, las tasas de mortalidad siguen aumentando o, en el mejor de los casos, se están estabilizando en muchos tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama, el cáncer de próstata y el cáncer colorrectal (OMS, 2020).

En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones donde los primeros tres tipos de cáncer que causaron mayores muertes fueron cáncer pulmonar (1,69 millones de defunciones), cáncer hepático (788 000 defunciones) y cáncer colorrectal (774 000 defunciones) (OMS, 2020). Para el año 2020, GLOBOCAN presentó un número estimado de nuevos casos de incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial, donde los tres tipos de cáncer con mayor

incidencia fueron el cáncer de mama con un 11,7% (2.261.419), cáncer de pulmón 11,4% (2.206.771) y en tercer lugar el cáncer colorrectal con un 10% (1.931.590); sin embargo, el número de muertes por cáncer para el mismo año, muestra al cáncer de pulmón en primer lugar (18%), pero no así para el cáncer colorrectal que ascendió a segundo lugar (9,4%) (Figura 1).

Ya que el cáncer colorrectal está ubicado dentro de los tres tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial es de importancia indagar más sobre los mecanismos moleculares que llevan a desencadenar esta enfermedad y aspectos celulares que permiten la progresión a estadios más graves, ya que en nuestro país este tipo de cáncer es el segundo con mayor incidencia (11,5%) y tercero con mayor mortalidad (11,1%) (Figura 2). En la región del Biobío la tasa de mortalidad por cáncer supera a la de enfermedad de sistema circulatorio, y más específicamente el cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en el tipo de cáncer con mayor incidencia. (DEIS/MINSAL 2018).

Número estimado de casos nuevos en 2020, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades



Número estimado de muertes en 2020, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades

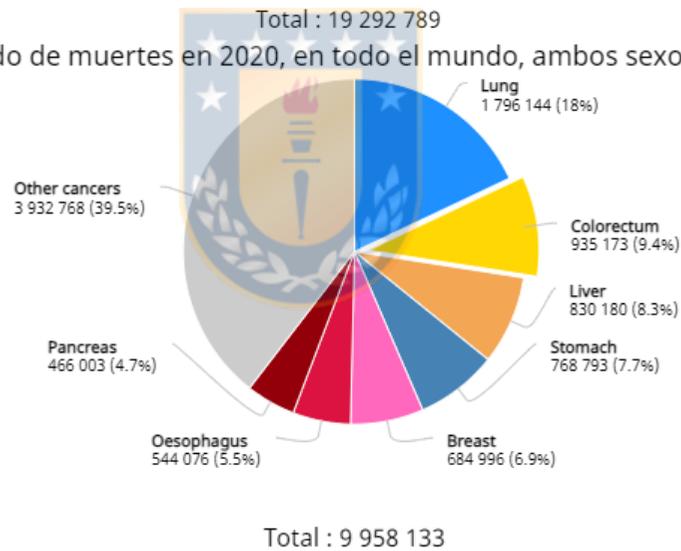
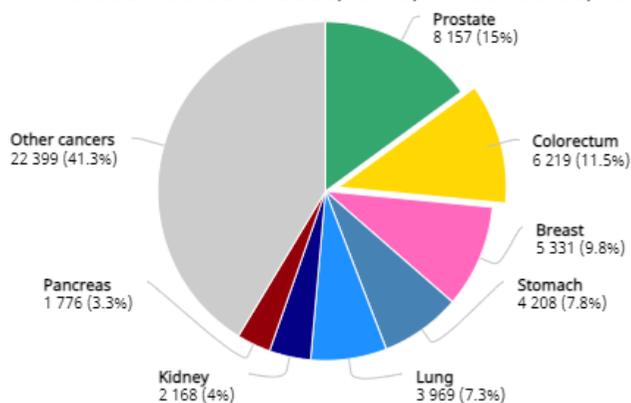


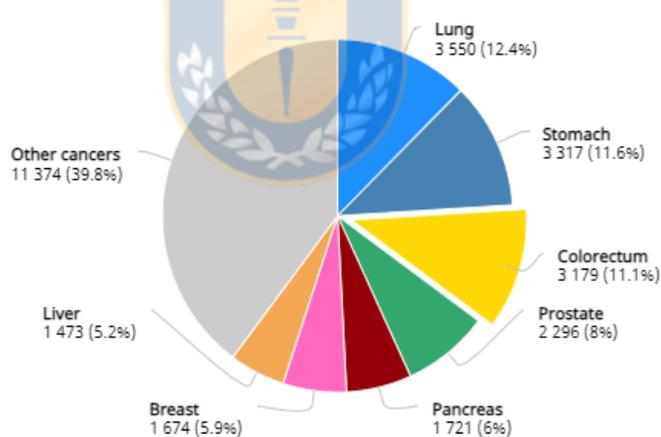
Figura 1. Incidencia y número de muertes por cáncer a nivel mundial. A) Número estimado de nuevos casos de cáncer en 2020 B) Número de muertes en 2020 por cáncer. En color amarillo se encuentra el cáncer colorrectal para ambas figuras Datos para todos los cánceres, ambos sexos y todas las edades. ("Global Cancer Observatory").

Número estimado de casos nuevos en 2020, Chile, ambos sexos, todas las edades



Total : 54 227

Número estimado de muertes en 2020, Chile, ambos sexos, todas las edades



Total : 28 584

Figura 2. Incidencia y muerte por cáncer en Chile. A) Número estimado de nuevos casos de cáncer en 2020. B) Número de muertes en 2020. En color amarillo se encuentra el cáncer colorrectal para ambas figuras. Datos para todos los cánceres, ambos sexos, todas las edades. (“Global Cancer Observatory”)

2.3 Cáncer Colorrectal.

El cáncer colorrectal (CCR) se desarrolla gradualmente durante el tiempo, presentando signos y síntomas poco específicos como debilidad, cansancio, dolor abdominal, cólicos, pérdida de peso y cambio en el aspecto de las deposiciones (diarrea o estreñimiento) (MINSAL/SEREMI DE SALUD BIOBIO). La detección de pequeños pólipos adenomatosos se asocian a un mayor riesgo de CCR al igual que otras condiciones, como inflamación intestinal, presencia de colitis ulcerosa y antecedentes familiares de la patología (Moore & Aulet, 2017).

La etiología del CCR es multifactorial; la edad, el sexo, factores ambientales, estilo de vida y la predisposición genética, aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Entre el 15-20% de los CCR son de tipo hereditarios como el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) y la poliposis adenomatosa familiar (PAF), mientras que el resto son de tipo esporádicos, donde no hay antecedentes personales y solo el 25% de las personas que lo padecen presentan antecedentes familiares de la enfermedad (Migheli & Migliore, 2012). Este tipo de CCR se subclasifica en 4 grupos a) hipermutado, b) no hipermutado, c) presencia de fenotipo metilado en Islas CpG que normalmente están restringidas a la metilación y d) alteración en microsatélites (Zamani, Hosseini, & Mokarram, 2018).

Entre todos los factores que contribuyen al riesgo de desarrollar CCR, se estima que el CCR causado por factores genéticos ocurre en aproximadamente el 30% de los casos (Moore & Aulet, 2017) y está dado por acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que superan los mecanismos de control de cada célula causando desregulación de la homeostasis y conduciendo a la neoplasia (Zamani et al., 2018). Estos dos escenarios pueden desarrollarse por sí solos, o coexistir en un mismo individuo (Wright, Beaty, & Ternent, 2017).

Las alteraciones epigenéticas, a diferencia de las genéticas, son reversibles y abarcan alteraciones que controlan la expresión genética sin cambiar la secuencia primaria de nucleótidos en el ADN, mediante la adaptación de la cromatina, y tienen un papel central en la patogénesis de varios tipos de cáncer, incluido el CCR. (Allis & Jenuwein, 2016; Jung, Hernández-Illán, Moreira, Balaguer, & Goel, 2020). Cambios en la metilación del ADN, modificaciones de histonas y/o alteración en ARN no codificantes pueden ser inducidas por factores externos o internos que podrían tener efectos similares a las alteraciones genéticas y se producen como eventos tempranos en el proceso de carcinogénesis, por lo cual las hacen potenciales objetivos terapéuticos para el desarrollo de nuevos tratamientos (Afanador A & Muñeton P, 2018; Jung et al., 2020; Migheli & Migliore, 2012; Terranova, Thomas, & Munster, 2016; Zamani et al., 2018).

2.4 Tratamientos para el cáncer colorrectal.

Existen diversos métodos convencionales de tratamiento del cáncer colorrectal que incluyen: cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, trasplante de células madre. Estos son aplicados a los pacientes diagnosticados dependiendo del tipo de tumor y el estado avanzado de la enfermedad y muchas veces se usan en combinación para potenciar los efectos, sin embargo, los resultados de estos están limitados por la toxicidad y los efectos adversos que generan en los pacientes sometidos. Algunos de los efectos adversos que provocan estos tratamientos, son la alopecia, anemia, delirios, diarreas, náuseas y vómitos, entre otros más, que evidentemente afectan la calidad de vida del paciente (Instituto Nacional del Cáncer).

Entre los tratamientos disponibles la terapia dirigida y la inmunoterapia son alternativas más específicas contra el cáncer por el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a ciertos puntos de control. Los anticuerpos administrados pueden marcar a las células cancerosas para que el sistema inmunológico las detecte y destruya con mayor facilidad o, detener directamente el crecimiento y provocar su autodestrucción.

Anticuerpos como bevacizumab, cetuximab y panitumumab son utilizados en conjunto con quimioterapia adyuvante. Bevacizumab actúa bloqueando la acción del Factor de crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) y, cetuximab y

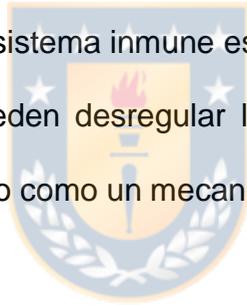
panitumumab actúan bloqueando el receptor del Factor de crecimiento Epidérmico (EGFR). Ambos blancos terapéuticos están involucrados en la migración celular, proliferación y crecimiento de las células tumorales. (MINSAL/Evaluación científica basado en evidencia)



2.5 Sistema inmune en el cáncer colorrectal.

Cada vez hay más evidencia que sugiere que el sistema inmunológico también desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo del CCR.

Para garantizar que el sistema inmunitario no dañe al huésped cuando reacciona a un antígeno extraño, los humanos han desarrollado proteínas y mecanismos de control inmunitario para frenar rápidamente una respuesta inmunitaria, estos son los llamados puntos de control inmunitarios (PCI). Los PCI son un componente vital del sistema inmune ya que protegen los tejidos adyacentes y sanos del daño cuando el sistema inmune está combatiendo a un patógeno. Sin embargo, los tumores pueden desregular la actividad de estas proteínas del punto de control inmunitario como un mecanismo de resistencia inmune (Dyck & Mills, 2017).



Los dos PCI que más se han estudiado son el antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) descubiertos por Tasuku Honjo y James Allison (Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2018)

CTLA-4 es un receptor que reside intracelularmente, pero se trasloca rápidamente a la superficie de células T activadas y regula la amplitud de las etapas tempranas de la activación de las células T al unirse a receptores CD80 y CD86 (pertenecientes a la familia de receptores B7) presente en células

presentadoras de antígenos (APCs). La función principal de CTLA-4 es contrarrestar la actividad del receptor co-estimulador de células T CD28. Ya que al interactuar con CD80/CD86 este provoca una señal negativa a la activación de las células T al hacer que CD80 / CD86 esté menos disponible para CD28, impidiendo una inmunidad excesiva y minimizando el daño a los tejidos normales adyacentes (Qind 2019) (Figura 3a).

PD-1 también conocido como CD279 es una molécula co-estimuladora del sistema inmune. Es un receptor de la superficie celular que interactúa con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 en APCs suprimiendo la activación y función de las células T para regular negativamente la respuesta inmune en el mantenimiento de la tolerancia periférica (S. Qin, Xu, Yi, Yu, & Wu, 2019; Wright et al., 2017)

En ciertas células tumorales, se ha observado un aumento de la expresión de PD-L1/PD-L2, en un intento de bloquear la respuesta inmune. La interacción de PD-1 y su ligando conduce a una mayor inhibición de la actividad de las células T a favor de la supervivencia de las células tumorales. (Byun, Wolchok, Rosenberg, & Girotra, 2017). El ligando primario expresado en los tumores sólidos son PD-L1 y las respuestas mediadas por las células T antitumorales se inhiben por la expresión de este en las células cancerígenas (Y. Iwai et al., 2002) (Figura 3b).

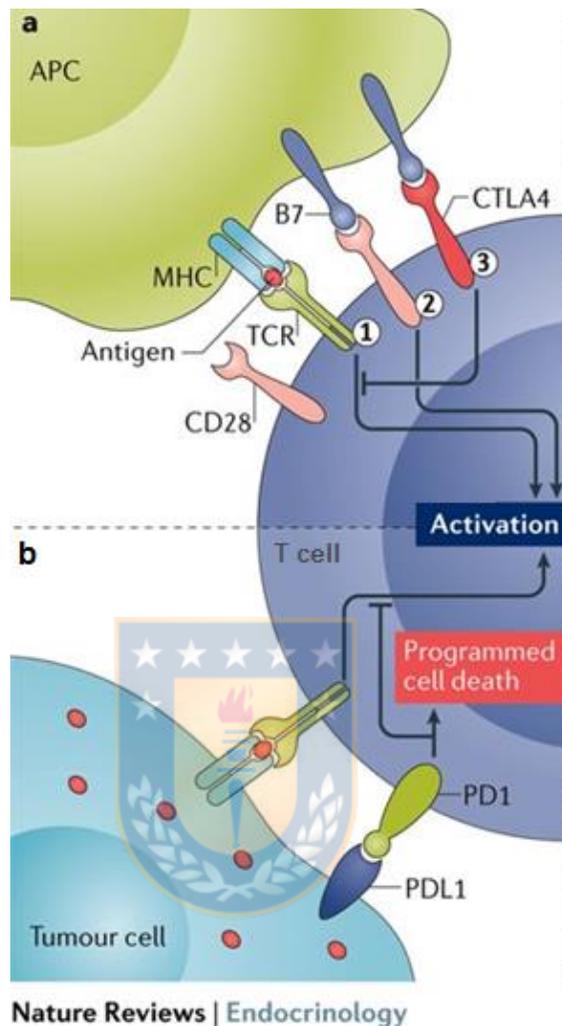
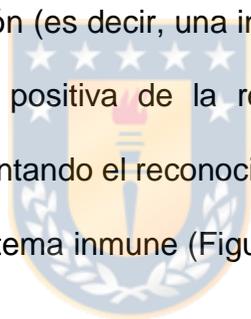


Figura 3. Mecanismo de acción de terapia de bloqueo de puntos de control. a) Se muestra la interacción normal del antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA4) con el ligando co-estimulador B7. La primera señal de activación se inicia cuando el receptor de células T (TCR) se une al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentando un antígeno en una célula presentadora de antígenos (APC) (1). Una segunda señal de activación se inicia cuando el receptor CD28 se une al ligando co-estimulador B7 en la APC (2). Los receptores CTLA4 que están presentes en las células T funcionan como un punto de control e inhiben la activación de las células T al superar a los receptores CD28 para unirse al ligando B7, lo que anula el efecto de la segunda señal de activación (3). B) Las células tumorales evitan la detección de células T imitando una APC con un ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1) inhibiendo el ligando al anular el efecto de la segunda señal de activación. Esto desactiva la célula T (Byun et al., 2017).

Una de las inmunoterapias para el tratamiento del cáncer se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales para bloquear puntos de control del sistema inmune, como el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y receptor de muerte celular programada (PD-1) presente en linfocitos T, y el ligando de PD-1, presente en células tumorales. Se ha demostrado que el bloqueo de PD-1 suprime la metástasis tumoral de líneas celulares de melanoma B16 y células de carcinoma de colon CT26 (Yoshiko Iwai, Terawaki, & Honjo, 2005). Lo mismo ocurre al utilizar un anticuerpo monoclonal contra PD-L1, ya que este puede bloquear la vía de supresión (es decir, una interacción PD-1/PD-L1) y dar como resultado una regulación positiva de la respuesta inmune e inhibición del crecimiento tumoral, aumentando el reconocimiento del tumor como extraño con el objetivo de activar el sistema inmune (Figura 4).



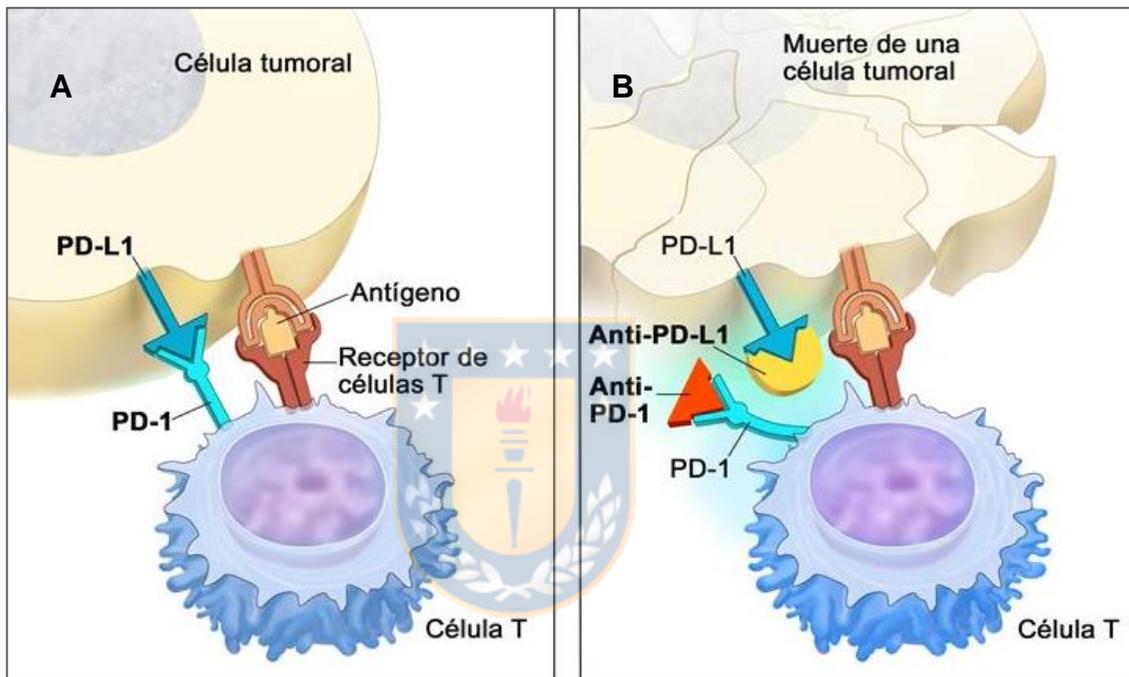


Figura 4. Puntos de control inmunitario receptor PD-1 y ligando PD-L1 A) Ligando PD-L1 se une a su receptor en la célula T e impide que destruya la célula tumoral. B) Bloqueo de PD-1 o PD-L1 con anticuerpo monoclonales permite que la célula T destruya la célula tumoral. (National Cancer Institute. Printed with permission © 2015 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights.)

A pesar de lo ventajoso que se ve esto, el porcentaje de pacientes que no responde a esta terapia sigue siendo alto, ya que las células cancerosas tienen una capacidad inherente de aprovechar diferentes vías de señalización y de factores de crecimiento para obtener ventajas de crecimiento y supervivencia celular. Por esto se ha dado paso a nuevos tratamientos para mejorar la eficacia, enfocados en el uso combinado de la inmunoterapia con la reguladores del procesos epigenéticos (Coutzac et al., 2017) ya que permiten dirigirse específicamente a estas vías para mejorar los tratamientos actualmente utilizados.



2.6 Regulación epigenética en Cáncer colorrectal.

En los últimos años, se han acumulado pruebas que indican que, aparte de los cambios genéticos, las alteraciones epigenéticas desempeñan un papel importante en el inicio y la progresión de la CCR (Migheli & Migliore, 2012). Entre los mecanismos epigenéticos más comunes se encuentran:

- Metilación de ADN. Es la mejor caracterizada y consiste en la adición de grupos metilos a residuos de citosina por enzimas Metiltransferasas y está relacionado estrechamente con una baja actividad transcripcional (Jung et al., 2020).
- ARN no codificantes. Los miRNAs son especies de ARN monocatenarias cortas (18–25 nucleótidos de longitud) que actúan como represores postranscripcionales al unirse a secuencias diana complementarias controlando la traducción de genes que pueden codificar proteínas que regulan procesos tumorigénicos como proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Jung et al., 2020).
- Modificaciones de Histonas. Las histonas, además de ser proteínas de empaquetamiento de ADN, pueden regular las secuencias de ADN subyacentes a través de complejas modificaciones postraduccionales en sus colas N-terminales, como la acetilación, metilación o fosforilación específica de aminoácidos entre otras.

En particular, la mayoría de los estudios de CCR están enfocados en la metilación de regiones promotoras de genes, pero la modificación de las colas de histonas se ha convertido en un mecanismo epigenético crítico en el CCR (Allis & Jenuwein, 2016; Migheli & Migliore, 2012).

En condiciones normales el ADN se envuelve alrededor de un complejo proteico octamérico que comprende un par de 4 proteínas histonas H2A, H2B, H3 y H4. Cada proteína del núcleo del octámero de histonas posee una cola característica que está enriquecida en residuos de lisina y arginina, y que están sometidos a modificaciones postraduccionales como acetilación, metilación o fosforilación, comúnmente realizadas en las histonas H3 y H4. Estas modificaciones permiten el acceso y restricción de factores de transcripción a la región promotora de los genes involucrados influyendo de esta forma en la expresión génica, activando o reprimiéndola (Bannister & Kouzarides, 2011).

El mecanismo de modificación de histonas es llevado a cabo entre otras, por un grupo de enzimas clasificadas en Histonas Acetiltransferasas (HAT) y Deacetilasas de Histonas (HDAC). Las primeras son las encargadas de agregar grupos acetilos a los residuos de lisina neutralizando la carga positiva del aminoácido para debilitar las interacciones entre las histonas y el ADN, y las segundas removiendo estas modificaciones restaurando la carga y estabilizando

nuevamente la arquitectura de la cromatina local respectivamente (Allis & Jenuwein, 2016).

Las modificaciones de histonas son un control fisiológico de toda célula, sin embargo, una desregulación de estas modificaciones puede afectar la expresión de genes involucrados en la regulación de las mismas, es decir, una desregulación en la acetilación o metilación de histonas puede afectar a los genes que codifican para las enzimas, como por ejemplo la Histonas acetiltransferasas, que cumplen el rol de acetilar residuos de Lisina en las colas de histonas. Estas desregulaciones en las modificación de las histonas se ha encontrado en una variedad de tipos de cáncer, incluso en cáncer colorrectal (Fraga et al., 2005).



2.7 Deacetilasa de Histonas.

Se ha documentado que la hipacetilación de histonas en regiones promotoras de genes supresores de tumores, genera una represión transcripcional de estos, mientras que la hiperacetilación de histonas está asociada con una alta expresión de protooncogenes. Este doble rol en el estado de acetilación de las histonas lo pueden cumplir las HDAC.

Se han identificado 18 HDAC humanas, las que se han agrupado en 4 clases que van de la clase I a la IV, donde la clase II se subdivide en IIa y IIb. Esta agrupación se basa en la homología que hay con proteínas deacetilasas de histonas en levaduras (Mariadason, 2008) (Tabla I).

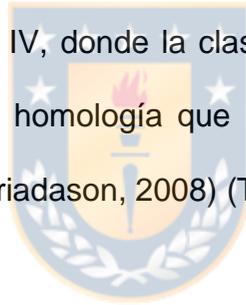


Tabla I: Clasificación de Histona deacetilasa de levadura y humana. Modificado de Marks et al., 2001

Grupo HDAC	HDAC levadura	HDAC humana
Clase I	Rpd3	HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC8
Clase IIa	Hda1	HDAC4 HDAC5 HDAC7 HDAC9
Clase IIb	–	HDAC6 HDAC10
Clase III	Sir2 Hst1 Hst2 Hst3 Hst4	SIRT1 SIRT2 SIRT3 SIRT4 SIRT5 SIRT6 SIRT7
Clase IV		HDAC11

La mutación o expresión aberrante de las HDACs, se ha observado a menudo en varias enfermedades humanas, especialmente en algunos tipos de cáncer (Fraga et al., 2005). El mal funcionamiento, ya sea por una alta o baja actividad de las HDACs, cumple un importante rol en el desarrollo y progresión del cáncer (Jung et al., 2020).

Investigaciones han demostrado que existe una alteración en los niveles de acetilación de ciertas histonas en células de cáncer. La acetilación de H4Lys9 en células primarias de cáncer de colon es significativamente mayor que células de mucosa normal, sin embargo otro estudio mostró que en líneas celulares de cáncer de colon HCT116 hay una disminución de la monoacetilación de H4 en comparación con células de mucosa de colon normal (Fraga et al., 2005). Esto respalda que el estado de acetilación controla la expresión/represión de diversos genes involucrados en el proceso tumorigénico.

Se conoce desde hace un tiempo que la deacetilación de la histona H3K9 en líneas celulares de tumores colorrectales se relaciona con la represión transcripcional de E-cadherina, proteína involucrada en la adhesión célula-célula, lo que conlleva una pérdida de la adhesión celular, provocando la invasión de tejidos adyacentes y metástasis, sin embargo se desconoce lo que provocaría la actividad de HDAC sobre estas histonas (Liu et al., 2008).

Sumado al importante rol que cumplen las HDACs en la regulación de la expresión génica, se ha demostrado que las modificaciones por deacetilación también se presentan en una amplia variedad de proteínas no histónicas.

Algunas proteínas que sufren modificaciones cumplen un rol clave en los procesos de fisiología y/o fisiopatología. Entre ellas podemos encontrar proteínas de la familia STAT relacionadas con la transcripción de genes del sistema inmune y vías oncogénicas, p53 en la reparación de daños al ADN y control del ciclo celular, HSP90 (proteína de choque térmico) que participa en el plegamiento de proteínas entre otras, donde la deacetilación afecta las funciones por diversos mecanismos como desregulación de la estabilidad de las proteínas, actividad enzimática, localización subcelular o control de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN (L. Chen, Fischle, Verdin, & Greene, 2001; Kovacs et al., 2005; Narita, Weinert, & Choudhary, 2019; Sharma et al., 2016; Yuan, Guan, Chatterjee, & Chin, 2005).

Las HDACs inicialmente fueron descritas para su acción en el núcleo modificando la acetilación de histonas, determinando su ubicación nuclear, sin embargo, la acción de HDAC sobre proteínas no histónicas, especialmente sobre proteínas de ubicación citoplasmática es gracias a que se ha descrito que algunos HDAC de clase II tienen sitios de fosforilación conservados en dominio N-terminal , lo que les permite su translocación al citoplasma (Parra & Verdin, 2010).

Dentro de la clase II de HDACs, se encuentra HDAC6, deacetilasa de histona predominantemente citoplasmática debido a la presencia de una secuencia de exportación nuclear (NES) y un motivo SE14, que se requiere para la retención citoplasmática (Figura 5).



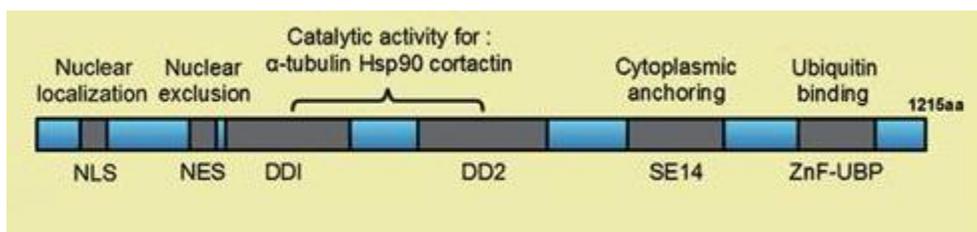


Figura 5. Esquema de los dominios de proteína HDAC6. La HDAC6 contiene dos dominios catalíticos funcionales (DD1 y DD2), que catalizan la actividad de desacetilación por ejemplo para α -tubulina y HSP90. La señal de exportación nuclear (NES) promueve la localización citoplasmática de la proteína, y la región del tetrapéptido que contiene Ser-Glu (SE14) asegura un anclaje estable de la enzima en el citoplasma. Aunque contiene una secuencia de localización nuclear (NLS), HDAC6 es predominantemente citoplasmática. El dominio ZnF-UBP, también conocido como el dominio PAZ, BUZ o DAUP e interactúa con proteínas ubiquitinadas y media la regulación de la degradación mediada por ubiquitinación (T. Li et al., 2018).

2.8 Histona deacetilasa de ubicación citoplasmática: HDAC6

Se ha descrito la participación de HDAC6 en varios sustratos de proteínas no histonas de procesos críticos, como la desestabilización de microtubulos por la hipoacetilación de α -tubulina, el buen funcionamiento de la proteína HSP90 promoviendo a la maduración del receptor de glucocorticoide y la viabilidad celular en respuesta al estrés por proteínas mal plegadas ayudando al reclutamiento a motores de dineína (Hubbert, Guardiola, & Shao, 2002; Kawaguchi et al., 2003; Kovacs et al., 2005) y por ser la única que contiene un dominio de unión a ubiquitina, siendo clave en la promoción de la degradación dependiente de la autofagia por el sistema ubiquitina-proteasoma (Pandey et al., 2007).



En conjunto, HDAC6 parece estar involucrada en la regulación de varias funciones celulares críticas íntimamente relacionadas con el cáncer a través de diversas vías, como la transformación de células oncogénicas, regulación del ciclo celular, reclutamiento hacia regiones promotoras de genes y en la migración e invasión de células cancerosas (Sakamoto & Aldana-Masangkay, 2011)

Además, la actividad HDAC6 puede afectar la expresión génica de algunas moléculas críticas del sistema inmunitario, incluidos los antígenos asociados a

tumores como el receptor de muerte programado-1 (PD-1) y el ligando-1 de receptor de muerte programada (PD-L1) (T. Li et al., 2018).

También se ha visto que HDAC6 desempeña un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia inmune ya que es un regulador de la vía STAT3. Con respecto a esto último, se ha informado que HDAC6 desempeña un papel importante en el reclutamiento a regiones promotoras del factor de transcripción STAT3 (Cheng, Lienlaf, Wang, et al., 2014).



2.9 STAT3 y PD-L1

La familia de proteínas STAT está compuesta por 7 miembros, cumplen las funciones de transducción de señales en el citoplasma y de factores activadores de la transcripción en el núcleo. La activación de proteínas STAT constan de la fosforilación y dimerización por medios de kinasas asociadas a receptores, que luego permiten su translocación al núcleo para cumplir sus funciones reguladoras al unirse a sus genes diana en el ADN (Reich & Liu, 2006).

En particular, el factor de transcripción STAT3 es un importante promotor transcripcional, y se ha visto que está involucrado no solo en la patogénesis y el desarrollo sostenible de muchos tumores malignos, sino también en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmune tumoral ya que es esencial para la transducción de señales extracelulares, además de ser un factor de transcripción nuclear necesario para la regulación de genes involucrados en la proliferación, supervivencia, angiogénesis e invasión tumoral, y promover mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas. (Yu, Pardoll, & Jove, 2009). Estas citoquinas reguladas por STAT3, como IL6, a su vez pueden activar aún más este factor de transcripción al unirse a sus receptores kinasas promoviendo una retroalimentación positiva y un microentorno inflamatorio.

La forma activada de STAT3 se ha asociado a algunos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer colorrectal, y está estrechamente relacionado con resultados clínicos adversos (Morikawa et al.,

2011). STAT3 juega un papel relevante en la regulación de protooncogenes y proteínas antiapoptóticas, como el caso de c-myc y MCL1 en líneas celulares HCT116 de cáncer colorrectal (Wei et al., 2019)

La principal vía de activación de STAT está mediada por Janus kinasa (JAK) asociada a receptores. Esta vía JAK/STAT está involucrada en procesos fisiológicos como función inmune, crecimiento celular, diferenciación y hematopoyesis. Sin embargo, también media el crecimiento, supervivencia, migración e invasión de células cancerígenas (Xiong et al., 2008). La sobre estimulación de la vía JAK/STAT promueve la forma activa de STAT3 y en CCR se ha visto un aumento de citoquinas inflamatorias como IL6, que reclutan células inmunes productoras de citoquinas proinflamatorias. IL6 es un ligando de los receptores activadores de la vía JAK/STAT (Chung & Chang, 2003).

Los supresores de la familia de proteínas de señalización de citoquinas (SOCs) son reguladores negativos de la vía JAK/STAT evitando la fosforilación de la quinasa y así la posterior activación de STAT. Sin embargo, la expresión de SOCSs está disminuida en algunos cánceres, lo que correlaciona la fuerte actividad de STAT3 (Isomoto, 2009; Trengove & Ward, 2013).

Se ha reportado además que STAT3 juega un papel relevante en varias vías relacionadas con el sistema inmune como el comportamiento de células

presentadoras de antígenos tolerogénicas regulando la expresión de PD-L1 (Wolfe et al., 2011).

Estudios recientes han aclarado que STAT3 regula la expresión de PD-L1 en las células presentadoras de antígeno, así como en una serie de células tumorales, como cáncer de pulmón, el melanoma, y cáncer colorrectal con el fin de inhibir la respuesta inmune frente al tumor (Abdelhamed, Ogura, Yokoyama, Saiki, & Hayakawa, 2016; P. Li et al., 2019; Lienlaf et al., 2016).

La regulación de la expresión de PD-L1 por STAT3 ha sido demostrada en diferentes estudios. En células de melanoma con baja expresión de STAT3, se mostró que pese a ser estimuladas con IL6 había una disminución de la expresión proteica de PD-L1 (Figura 6) (Jiang, Zhou, Giobbie-Hurder, Wargo, & Hodi, 2013). Además, en células de cáncer de ovario, al sobreexpresar SOCS-1 se observó el mismo efecto por la inhibición de la vía JAK/STAT3 (Nakagawa et al. 2016). Por último, en un estudio en células de cáncer colorrectal, al estimular la vía JAK/STAT3 por medio del receptor FGFR2 para el factor de crecimiento de fibroblastos, se observó un aumento de la fosforilación de STAT3 y aumento de la expresión de PD-L1, lo que no ocurría al bloquear la vía con inhibidores de JAK, esto refuerza aún el rol que cumple STAT3 en la regulación de la expresión de PD-L1 (P. Li et al., 2019).

Con el fin de disminuir la activación de STAT3, se encontró que al utilizar inhibidores de HDAC como TSA, en células de cáncer colorrectal la activación de STAT3 se veía afectada por el consiguiente aumento de los bloqueadores de la vía JAK/STAT3 (SOCS1 Y SOCS3) regulando indirectamente la activación de STAT3 y los genes dianas involucrados (Xiong et al., 2012).



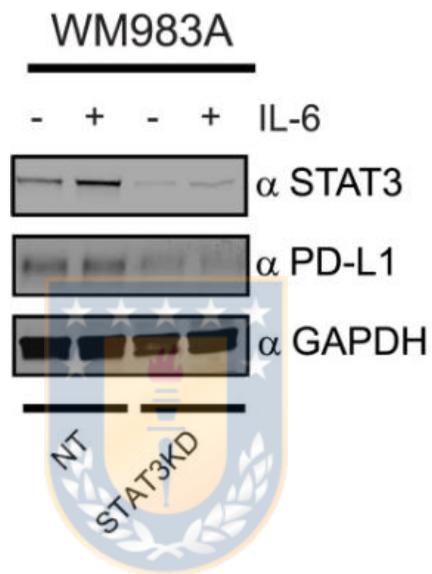


Figura 6. Expresión de receptor PD-L1 y STAT3. Células de melanoma WM983A se trataron con IL6 (30 ng/mL) y otras se dejaron sin tratamiento. Se evaluó la presencia de STAT3, PD-L1 y GAPDH como control de carga, mediante WesternBlot. NT: no tratadas, STAT3KD: knockdown (Lienlaf et al., 2016)

2.10 HDAC6 modula la activación de la vía STAT3

Se ha descrito que HDAC6 es una enzima citoplasmática, sin embargo se ha encontrado en extractos nucleares de APCs y se ha visto su participación en la regulación de factores de transcripción específicos y promotores de genes que participan en la mediación de respuestas inflamatorias e inmunes (Cheng, Lienlaf, Perez-villarroel, et al., 2014; Seidel, Schnekenburger, Dicato, & Diederich, 2015). Por ello se ha probado su rol en la activación de STAT3.

Se conocía previamente que HDAC6 estaba involucrado en la regulación génica de IL10 en APCs, y que su ausencia provocaba la disminución de esta citoquina en macrófagos (Cheng, Lienlaf, Perez-villarroel, et al., 2014). Se conocía también que la expresión de IL10 esta mediada por el factor de transcripción STAT3 (Ray, Lee, Hou, Boldogh, & Brasier, 2008; R. Wang, Cherukuri, & Luo, 2005). Estos antecedentes llevaron a sugerir que la participación de la HDAC6 en la activación de la ruta de STAT3 puede ser regulada si se interviene e influir en la actividad transcripcional de genes diana.

Estudios en APCs y células cancerígenas de melanoma y osteosarcoma mostraron que en ausencia o inhibición genética de HDAC6 se encontraba una menor fosforilación de STAT3 en su residuo Y705 (Figura 7) modificación importante para su activación, además un menor reclutamiento en la región promotora de sus genes diana, como IL10 y SOCS3, sin alterar su expresión, ni

estado de acetilación. (Cheng, Lienlaf, Perez-villarroel, et al., 2014; Keremu, Aimaiti, Liang, & Zou, 2019; Lienlaf et al., 2016).

Además, en uno de los mismos estudios se evidenció que HDAC6 interacciona formando un complejo proteico aun no caracterizado con STAT3 para ser reclutados en la misma secuencia de la región promotora del gen de IL10, demostrando así su importante rol fuera de las modificaciones de histonas (Cheng, Lienlaf, Perez-villarroel, et al., 2014).



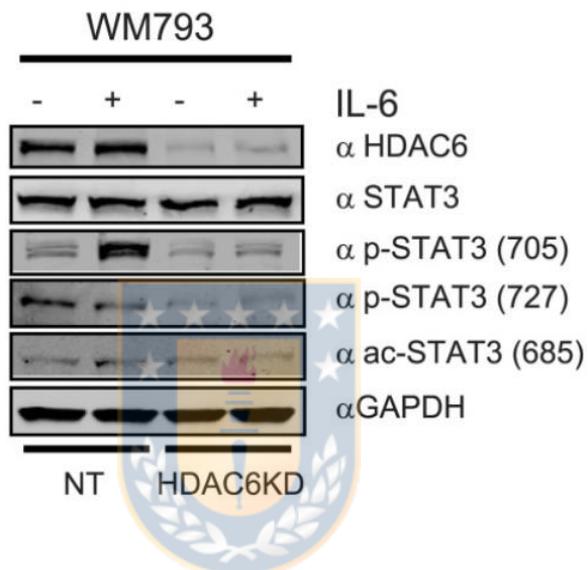


Figura 7. Activación de factor de transcripción STAT3. La baja expresión de HDAC6 (HDAC6KD) altera la activación de factor de transcripción STAT3 en células de melanoma. Células de melanoma WM793 se trataron con IL6 y otras se dejaron sin tratar. Se evaluó la presencia de HDAC6, STAT3, ambas isoformas de STAT3 fosforilada (p-STAT3 705 y p-STAT3 727) y STAT3 acetilada (ac-STAT3 685), Se utilizó GAPDH como control de carga. NT: no tratadas, KD: knockdown (Lienlaf et al., 2016)

2.11 HDAC6 controla indirectamente la expresión de PD-L1.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que STAT3 es un regulador transcripcional de la molécula co-estimuladora inmune PD-L1 a través de diferentes rutas, siendo la más estudiada la vía JAK/STAT3, y en adición a esto, HDAC6 puede modular la actividad de este factor de transcripción en células de melanoma, osteosarcoma y células del sistema inmune. Por consiguiente, se sugiere que HDAC6 podría controlar indirectamente la expresión de PD-L1 mediante la modulación de la activación de STAT3. Diferentes estudios demuestran que la inhibición farmacológica o genética de HDAC6, en distintos modelos celulares conlleva una disminución de los niveles de ARNm y expresión proteica para PD-L1 (Figura 8) dando una correlación en la disminución de estos, al ser comparado con sus modelos normales, tratadas y no tratadas con estimuladores de la vía STAT3, como IL6 (Lienlaf et al., 2016).

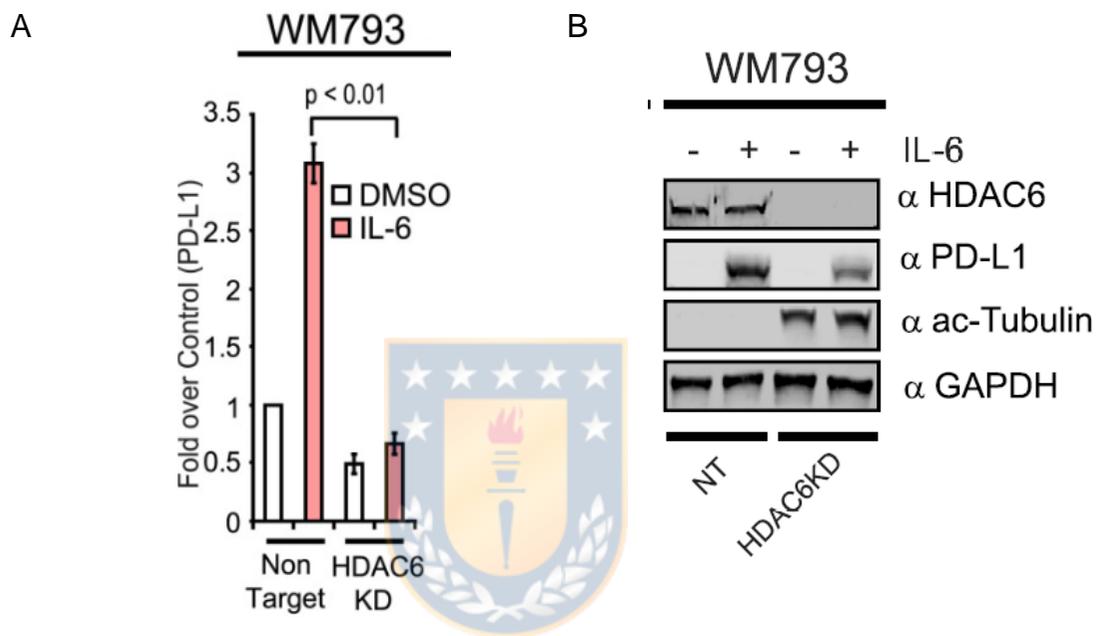


Figura 8. Modulación de expresión de PD-L1 por HDAC6. A) Se aisló ARN total en células de melanoma WM793 tratadas con IL6 (30ng/mL) y sin tratar. La expresión de ARNm de PD-L1 se analizó mediante qRT-PCR cuantitativa. B) Análisis de Inmunoblot de PD-L1, tubulina acetilada y proteínas GAPDH en células de melanoma no tratadas (NT) y HDAC6KD WM793 bajo estimulación de IL-6 (30 ng/mL) (Lienlaf et al., 2016)

2.12 Inhibidores de HDAC.

Las histonas deacetilasas son el objetivo de varios compuestos estructuralmente diversos conocidos como inhibidores de HDAC (HDACinh), clasificados como pan-Inhibidores o específicos para cada una de las HDACs descritas. Estos compuestos pueden inducir diferenciación celular, detención del ciclo celular y apoptosis de células transformadas (Villagra, Sotomayor, & Seto, 2010). A pesar de los efectos bien documentados de los HDACinh en el control del ciclo celular y la apoptosis, no se conoce completamente su participación en las vías relacionadas con el sistema inmune.



Con todo lo documentado sobre la participación de HDAC6 en la modulación de la expresión de PD-L1 en células de cáncer, se abre la posibilidad de intervenir indirectamente la expresión de PD-L1 a través de la inhibición específica de la HDAC6, que por consiguiente regularía la fosforilación del factor de transcripción STAT3 y posteriormente podría generar inactivación de sus genes diana, incluyendo niveles de citoquinas y genes relacionados con el sistema inmune (Cheng, Lienlaf, Wang, et al., 2014). Por lo tanto, este tratamiento podría dar paso a una terapia combinada en conjunto con el bloqueo específico de receptores de punto de control inmune para el tratamiento de este tipo de cáncer, así como otras neoplasias.

Finalmente, ante los antecedentes expuestos, y dada la incidencia del cáncer colorrectal en Chile, además del desconocimiento de como la modulación de HDAC6 por inhibición específica, afectaría la activación y la expresión de STAT3 y moléculas co-estimuladoras del sistema inmune como PD-L1 en este tipo de cáncer, surge la pregunta ¿Cuál es el rol de HDAC6 en la expresión del receptor PD-L1 y la funcionalidad del factor de transcripción STAT3 en células de cáncer colorrectal?, por lo que se sugiere la siguiente hipótesis.



3 HIPÓTESIS

“La inhibición específica de HDAC6 disminuye la expresión de PD-L1 sin afectar la expresión del factor de transcripción STAT3 en líneas celulares de cáncer colorrectal”



4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la expresión de PD-L1 y STAT3 en líneas celulares de cáncer colorrectal.

4.2 Objetivos específicos.

4.2.1 Evaluar el efecto citotóxico de los compuestos inhibidores de HDAC6 en líneas celulares de cáncer colorrectal.

4.2.2 Determinar los niveles de expresión de PD-L1 y STAT3 en células de cáncer colorrectal luego del tratamiento con inhibidor de HDAC6.

4.2.3 Analizar la presencia de sitios de unión para el factor de transcripción STAT3 en la región promotora del gen PD-L1.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y líneas celulares.

5.1

Se trabajó con células no tumorales de epitelio normal de colon CCD841 CoN (ATCC® CRL1790™), células de carcinoma de colon HCT116 (ATCC® CCL247™) y célula de adenocarcinoma de colon HT29 (ATCC® HTB38™). El cultivo se realizó en placas con medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino 10% (GE Healthcare), L-glutamina 4 mM (Hyclone), bicarbonato de sodio 1,5 mg/mL y glucosa 4,5 mg/mL. A cada medio se le adicionó 50 U/mL de penicilina/estreptomicina (Hyclone). La incubación de todas las líneas celulares fue a 37°C con un ambiente al 5% de CO₂.

5.2

Inhibidores de Histonas deacetilasas.

Se utilizaron 2 inhibidores de HDACs, uno específico para HDAC6, Nexturastat A y como control se utilizó el pan-inhibidor de HDACs, Panobinostat. En un principio, los inhibidores de HDACs fueron donados por el Dr. Alejandro Villagra (USA), posteriormente fueron adquiridos en MedChemExpress (USA).

Ensayo de citotoxicidad.

Para evaluar el nivel de toxicidad de algunos compuestos, se analizó la viabilidad celular por el método XTT. Este ensayo se basa en la modificación del método MTT, en el cual se mide la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, generando cristales insolubles. El XTT tiene base en la reducción de la sal de sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) por las deshidrogenasas mitocondriales hasta cristales de formazan (solubles), reacción acelerada por la adición de un acoplador de electrones como es el Fenasin Metosulfato (PMS). Para esto se sembraron 10^4 células en placas de 96 pocillos, donde los pocillos de los bordes se utilizaron solo con PBS para evitar el secado de la placa. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado a 37°C con 5% CO_2 por 24 horas con tratamientos exploratorios a diferentes concentraciones; 0.1nM, 10nM, 100nM y 1000nM de inhibidores Panobinostat y Nexturastat A, y tratamiento de inhibición específica de Nexturastat A a concentraciones 0.5uM, 1uM, 5uM y 10uM. La viabilidad celular se detectó mediante el kit Cell Proliferation de Biological Industries (20-300), el cual se diluyó en medio de cultivo DMEM sin rojo fenol preparado como se indica anteriormente la preparación del medio DMEM. Se incubó por 4-5h hasta observar coloración naranja. Finalmente se leyó absorbancia a 490 nm en lector de microplacas ELx800 (BioTek Instrument).

Ensayo de apoptosis con Incorporación de Ioduro de Propidio (IP) y Anexina V.

5.4

Se cultivaron 2×10^5 células en placa de 12 pocillos y fueron expuestas a 0,1 nM, 100nM y 1000nM por 24 horas con Nexturastat A. Se recolectó el medio en tubos Falcon de 15mL y se lavaron con PBS 1X para posteriormente recolectar las células por arrastre mecánico.

Los tubos con células se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS 1X, repitiendo el lavado dos veces. Luego de la última centrifugación, se re suspendió el pellet en 200 uL de Staining Buffer 1X. Se colectaron 100uL de cada muestra en tubos Can para citometría y se agregaron 5uL de Ioduro de Propidio y 5uL de Anexina V. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 400 uL de Staining Buffer 1X y se analizó en citómetro de flujo (FACS Canto II, BD) en menos de 1 hora manteniendo en frio y oscuridad.

5.5

Aislamiento de ARN y Retrotranscripción

Con el objeto de caracterizar las líneas celulares en nuestras condiciones de estudio y determinar la expresión de genes asociados al fenotipo y de respuesta inmune se realizaron ensayos de RT-PCR para los ARNm de diferentes genes con el fin de obtener ADNc.

Las células fueron sembradas a 5×10^5 células por placa y se trataron con 1 μM y 5 μM de Nexturastat A inmerso en DMEM por diferentes periodos de tiempo; 2h, 4h, 8h, 16h a 37°C con 5% CO_2 . Como control se usaron células que no fueron expuestas a tratamiento y fueron retiradas junto con las muestras de 16 horas. Para todos los ensayos se aisló ARN total desde las células utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Luego de la obtención del ARN, se sintetizaron los correspondientes ADNc por retrotranscripción mediante la utilización de transcriptasa reversa (M-MLV Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante en termociclador ABI (Modelo MiniAmp Plus) Applied Biosystem (ThermoScientific).

5.6

PCR en tiempo real.

Para cuantificar los experimentos de transcripción reversa, se analizaron los productos en experimentos de PCR en tiempo real. Luego de la obtención de los ADNc se realizaron amplificaciones mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para los diferentes genes detallados en la tabla II solicitados a Integrated DNA Technologies. Estos experimentos se realizaron en el equipo LightCycler 480 de Roche, mediante el uso del Kit KAPA SYBR® FAST Universal (ROCHE-SigmaAldrich). La cuantificación relativa de cada gen se calculó usando $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando 18S como gen de referencia.

Partidores para detección de expresión de ARNm y análisis de sitios de unión.

5.7

Los partidores específicos disponibles en nuestro laboratorio y los nuevos específicos para este trabajo, se enviaron a sintetizar a IDT (Fermelo) (Tabla II y III).

Tabla II: Oligonucleótidos sintetizados para análisis de RT-PCR

Gen específico	Secuencia 5' - 3'
Hu PD-L1 Fw E4	TCCTGAGGAAAACCATACAGC
Hu PD-L1 Re E5	GATGGCTCCCAGAATTACCA
hSTAT3 Fw E15	CTTTGAGACCGAGGTGTATCACC
hSTAT3 Re E16	GGTCAGCATGTTGTACCACAGG
18S_F	GTAACCCGTTGAACCCATT
18S_R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Tabla III: Oligonucleótidos sintetizados para análisis de sitios de unión.

PD-L1_F1-264	ATCTTCGAAACTCTTCCCGG
PD-L1_R1-131	CGGAAGCTTTTCAGTTTAGGT
PD-L1_F2-222	ACTGGACTGACATGTTTCACT
PD-L1_R2-93	GCCGGGCGTTGGACTTTC
PD-L1_F3-446	ATGTCAAGATGTTTCAGTCACC
PD-L1_R3-319	CCAACATCTGAACGCACCTTG

Obtención de extractos totales de proteína

Las células fueron sembradas a 5×10^5 células por placa y se trataron con 1 uM y 5uM de Nexturastat A inmerso en DMEM para diferentes periodos de tiempo; 4h, 8h, 16h y 24h a 37°C con 5% CO₂. Como control se usaron células que no fueron expuestas a tratamiento y fueron retiradas junto con las muestras de 24 horas. Luego del tratamiento se lavaron 2 veces con PBS 1X, se adicionó PBS 1X y se colectaron las células por arrastre mecánico en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Luego los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 2000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se adiciono al pellet obtenido 40uL de tampón de lisis [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 10% glicerol; 200 mM NaCl₂; 2,5 mM MgCl₂; 1% Tritón X-100; inhibidores de proteasas; inhibidor de fosfatasa (Sigma)]. Se dejó en agitación por 20 minutos a 4 °C, momento en que se centrifugaron los lisados celulares a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante y finalmente, se obtuvo la concentración de proteínas totales por el método Bradford (Según datos del fabricante).

5.9 Electroforesis de proteínas y Western blot.

La caracterización de las líneas celulares en nuestras condiciones de estudio involucró también electroforesis de proteínas y ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos para la expresión de diferentes proteínas PD-

L1, STAT3 y HDAC6. Para la electroforesis de proteínas, las muestras se denaturaron en buffer de carga (50 mM Trizma-Cl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol). Luego las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (29:1) /SDS 0.1% al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a 120 Volt constante por 180 minutos en buffer de corrida 1X (25 mM Tris-Base, 250 mM glicina, 0,1% SDS) en una minicámara (Mini PROTEAN 3, BIO-RAD). Una vez terminada la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF immobilon-E (Thermo scientific) en buffer de transferencia 1X (39 mM glicina, 48 mM Tris-Base, 0,037% SDS, 20% metanol) a 250 mA corriente constante durante 2h. La membrana se bloqueó con solución TBS/Tween 0.1%/leche descremada 5%. La membrana bloqueada y lavada con TBS/Tween se incubó con anticuerpos específicos para los ensayos a realizar, en solución TBST overnight a 4°C. Luego se lavaron las membranas con TBST, durante 5 minutos repitiendo esto 3 veces. Después la membrana se incubó con un segundo anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo y acoplado a peroxidasa (IgG mouse o rabbit HRP) en solución TBST a temperatura ambiente entre 1-2 horas. Finalmente, se realizaron lavados de la misma manera que para el primer anticuerpo y la detección se llevó a cabo con reactivos ECL de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™) y se visualizó en equipo fotodocumentador para quimioluminiscencia OmegaLumG (Aplegen).

2.10 Análisis in silico de promotor de PD-L1.

Se obtuvieron secuencias del promotor para *PD-L1* de dos especies diferentes, humano y ratón, utilizando el programa online Eukariotic Promoter Database disponible en <https://epd.epfl.ch/> seleccionando la región a analizar, 1000pb corriente arriba (-1000) desde el TSS y unos 100pb del 5'UTR.

Luego de obtenidas las secuencias se realizó un alineamiento de las secuencias mediante el servidor ClustalW disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Finalmente, se utilizó el programa TFBind disponible en <http://tfbind.hgc.jp/> para encontrar sitios de unión específicos para el factor de transcripción STAT3 en la secuencia de ADN de la región promotora de *PD-L1* para ambas especies analizadas.

5.11 Optimización de PCR para análisis de sitios de unión.

La mezcla de PCR se preparó en 10 μ L de reacción final utilizando 50ng de ADN genómico o cromatina sonicada de células HEK-293 (humano) previamente dispuesta en el laboratorio, en presencia de 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$, 20 pmoles de cada partidor (Tabla III), 2 unidades de TAQ Sapphire Amp (Takara). La reacción de PCR se llevó a cabo empleando distintas temperaturas

de alineamiento de 50-55-60°C para determinar las condiciones óptimas para cada fragmento en particular. Cada región contempla su respectivo control negativo de reacción. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador ABI (Modelo MiniAmp Plus) (Applied Biosystem).

5.12 Análisis estadístico

Todos los ensayos son resultado del promedio de 3 o 5 experimentos independientes realizados en triplicado o quintuplicado, donde se obtuvo la desviación estándar de cada experimento (incorporado en cada figura). Los análisis estadísticos fueron realizados por t-Student (valores de significancia * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

6 RESULTADOS

1.1 Evaluación del efecto citotóxico del tratamiento con inhibidores de HDAC6 en células de cáncer colorrectal.

1.1.1 Determinación de la función mitocondrial en células en cultivo tras un tratamiento exploratorio.

Para evaluar el efecto de inhibidores HDACs sobre la viabilidad celular in vitro, se realizó un tratamiento exploratorio sobre las líneas celulares de colon CCD841, HT29 y HCT116 a diferentes concentraciones gradualmente crecientes con el pan-inhibidor Panobinostat y un inhibidor selectivo de HDAC6 Nexturastat A a concentraciones final de 0.1, 10, 100, 1000 nM, el cual fue analizado con el ensayo XTT luego de 24 horas de incubación.

El ensayo mostró que ambos inhibidores afectan de forma dependiente de la concentración a las tres líneas celulares de colon (Figura 9). A partir de 0,1nM se observa un notorio descenso de la viabilidad celular en el tratamiento con Panobinostat, mientras que con Nexturastat A la disminución de viabilidad se evidencia a una concentración de aproximadamente 100nM para las tres líneas celulares. A la máxima concentración estudiada de ambos inhibidores 1000nM, se observa que Panobinostat disminuye la viabilidad celular a aproximadamente la mitad, siendo la línea HCT116 un poco más resistente al pan-inhibidor, sin

embargo, con Nexturastat A la viabilidad celular solo disminuye a un 70% aproximadamente al utilizar esta misma concentración en las tres líneas celulares comparados con sus respectivos controles sin tratamiento con los inhibidores de HDACs



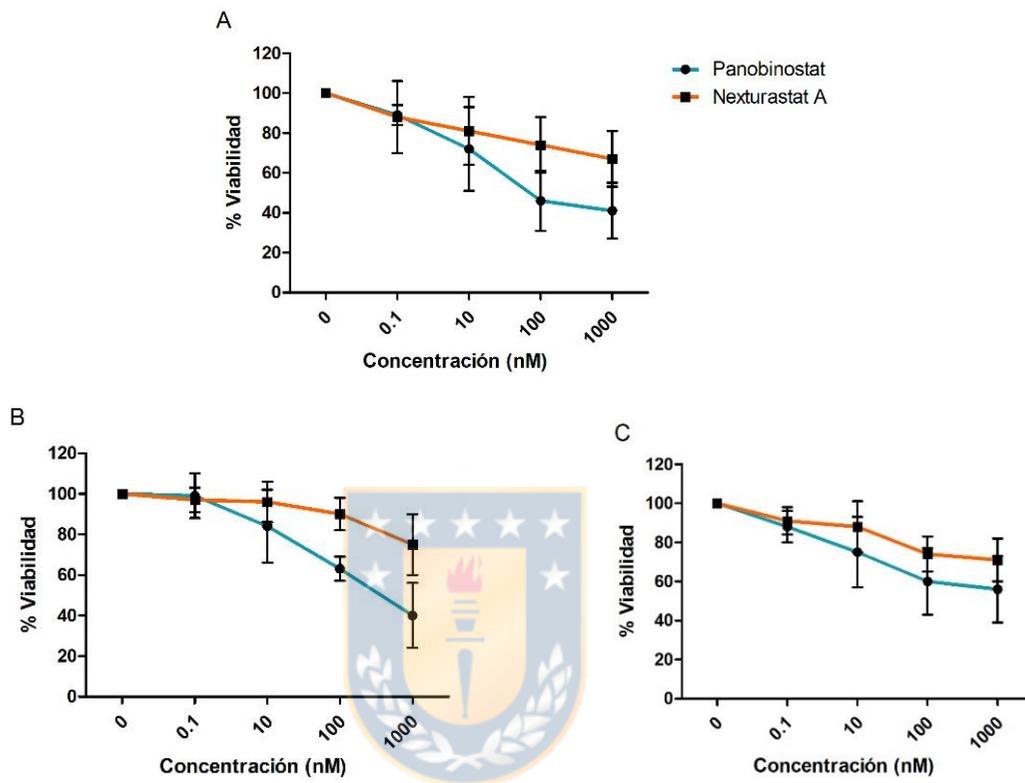


Figura 9: Viabilidad celular luego de tratamiento con inhibidores HDACs. Análisis de viabilidad celular realizado mediante ensayo XTT, luego del tratamiento exploratorio con dos inhibidores de HDACs (Panobinostat, Nexturastat A) a diferentes concentraciones. Línea celular de colon CCD841 (A) y línea celular de cáncer de colon HT29 (B) y HCT116 (C). Los resultados son el promedio de 6 experimentos independientes con tratamiento de exposición de 24 horas.

1.1.2 Determinación de la muerte celular por apoptosis.

Para investigar el efecto inductor de apoptosis del inhibidor Nexturastat A en las tres líneas celulares de colon CCD841, HT29 y HCT116, se realizó un ensayo de Apoptosis por Incorporación de Ioduro de Propidio y Annexina V por citometría de flujo.

Primero las células de colon normal y cáncer de colon fueron reconocidas según tamaño y granularidad característica en un dot plot, donde estos parámetros fueron indicados por forward scatter (FSC) y side scatter (SSC). Dentro de las células se seleccionó un grupo de células individuales o singletes para luego seleccionar la población de células apoptóticas, esto último se logra utilizando tinción dual de Ioduro de Propidio y Annexina V-FITC como marcador. Cada línea celular se analiza de forma independiente.

Las tres líneas celulares CCD841, HT29 y HCT116 se trataron con concentraciones crecientes de Nexturastat A (0.1nM, 100nM, y 1000 nM) durante 24 horas. El análisis de citometría de flujo mostró aumentos del porcentaje de células apoptóticas de una manera dependiente de la concentración en las tres líneas celulares (Figura 10A).

Al estudiar el aumento de la muerte celular de las tres líneas celulares con respecto al control sin tratamiento con Nexturastat A se observa que a la concentración mínima estudiada de 0,1nM de inhibidor no hay cambios para las líneas celulares CCD841 y HT29, mientras que para HCT116 se evidencia un pequeño aumento en 0,2 veces con respecto al control sin tratamiento (Figura 10B).

Al aumentar la concentración a 1000nM de Nexturastat A se observa que en las tres líneas celulares la muerte aumenta con respecto al control, y la línea celular HCT116 sigue mostrando un aumento mayor en la muerte en comparación con las otras dos líneas celulares en 0,5 veces sobre el control, mientras que la líneas celulares CCD841 y HT29 solo aumentaron 0,2 y 0,4 veces respectivamente con respecto al control sin tratamiento.

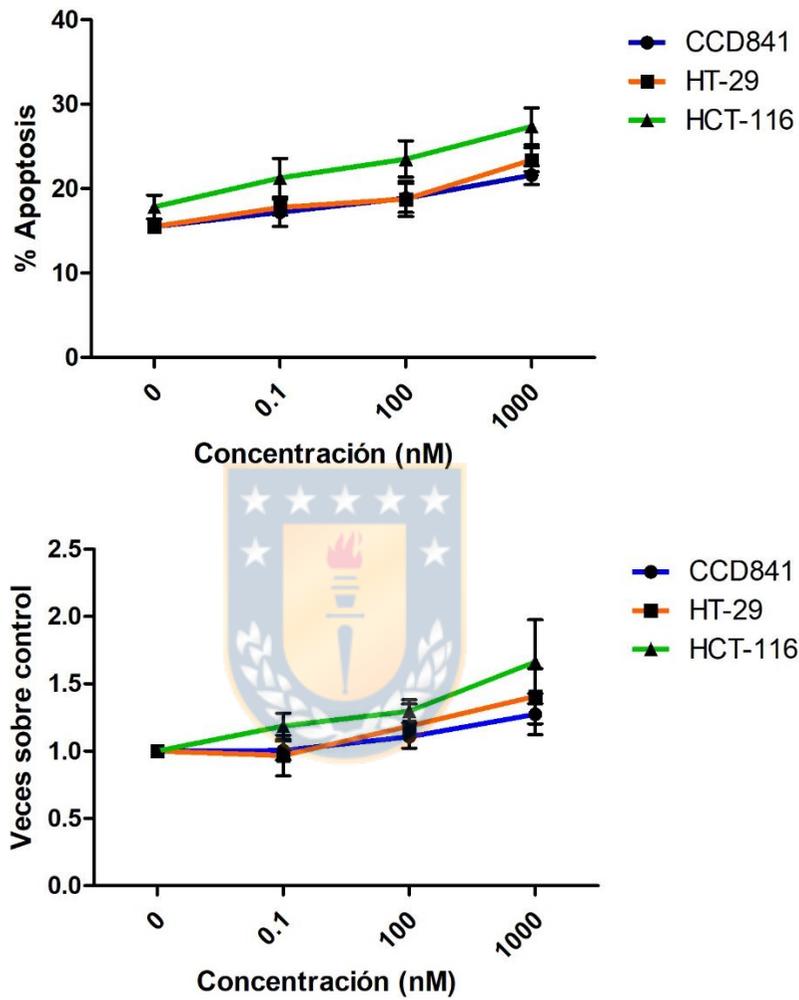


Figura 10: Muerte celular por tratamiento con Nexturastat A. Análisis de muerte celular por citometría de flujo utilizando IP y Annexina V luego del tratamiento con Nexturastat A en células CCD841, HT-29 y HCT-116. Porcentaje de células apoptóticas (A) representan las células muertas contadas en relación al total de la población celular, y veces de aumento de muerte sobre el control sin tratamiento (B). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes con 24 horas de tratamiento.

1.1.3 Disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración de Nexturastat A.

Luego de la exploración del efecto del inhibidor selectivo Nexturastat A a bajas concentraciones, se indagó su efecto con tratamientos a concentraciones más altas, aumentando el rango hasta los 10uM.

El ensayo de viabilidad XTT mostró que las tres líneas celulares de colon utilizadas nuevamente presentan una sensibilidad al tratamiento, con una respuesta dependiente de la concentración (Figura 11).

A una concentración de 0,5uM de inhibidor ya se observa una leve disminución de aproximadamente un 10% en el porcentaje de viabilidad celular comparadas con sus controles respectivos sin tratamiento en las tres líneas celulares estudiadas. A partir de 1uM de inhibidor la viabilidad celular para las dos líneas de cáncer de colon HT29 y HCT116 desciende en un porcentaje mayor en comparación con la línea celular de colon normal CCD841. Para la concentración más alta utilizada de Nexturastat A se muestra una disminución de la viabilidad en aproximadamente un 60% para ambas líneas de cáncer de colon, sin embargo, solo un 30% aproximadamente para la línea CCD841.

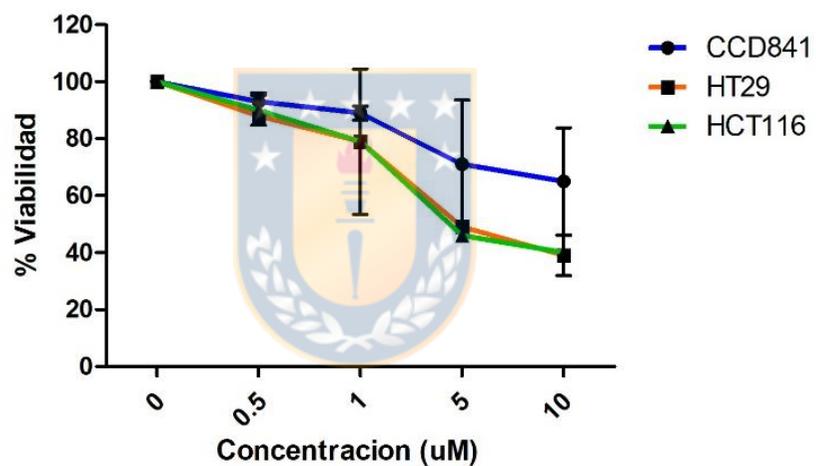


Figura 11: Viabilidad celular luego de tratamiento con Nexturastat A a mayor rango de concentraciones. Análisis de viabilidad celular realizado mediante ensayo XTT, luego del tratamiento con inhibidor selectivo de HDAC6 Nexturastat A a concentraciones gradualmente crecientes durante 24 horas. Control sin tratamiento (0uM). Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.

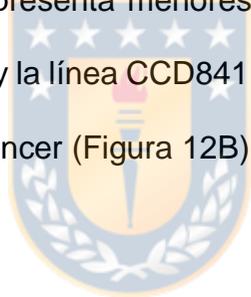
1.2 Determinar los niveles de expresión de PD-L1 y STAT3 en células de cáncer colorrectal luego del tratamiento con inhibidor de HDAC6.

Con el objetivo de determinar la expresión de proteína y ARNm de PD-L1 y STAT3 luego de la exposición al inhibidor selectivo de HDAC6 en líneas celulares normales y cancerígenas de colon CCD841, HT29 y HCT116, se realizó un tratamiento con 1uM y 5uM de Nexturastat A a distintos tiempos de incubación, dependiendo si se quiere evaluar transcripción (ARNm) o traducción (proteína). El grupo control fue tratado con el vehículo de droga, en este caso DMSO, bajo las mismas condiciones de tratamiento. Luego de la transcripción inversa del ARN total y extracción de proteínas totales de las líneas celulares utilizadas, se procedió a la cuantificación relativa de ARNm mediante PCR en tiempo real y análisis de expresión de proteínas por WesternBlot respectivamente.

1.2.1 Determinación de los niveles basales de expresión transcripcional de las moléculas inmuno-estimuladoras.

Para tener claridad sobre la expresión transcripcional de PD-L1 y STAT3, y poder realizar una comparación en el aumento o disminución de los niveles, se realiza un análisis sin tratamiento con inhibidores en las tres líneas celulares estudiadas y se determinaron los niveles relativos de expresión basal de estos genes.

Los resultados obtenidos indican que las tres líneas celulares expresan los genes de las moléculas inmuno- estimuladoras PD-L1 y STAT3. Sin embargo, los niveles de expresión difieren en cada una de las líneas. Se observa que los niveles relativos de ARN mensajero para PDL1 y STAT3 son bajos para la línea de colon normal CCD841 y más altos en las dos líneas celulares de cáncer colorrectal. Sin embargo, la línea HCT116 posee niveles más altos de PD-L1 en comparación a HT29 (Figura 12A). De forma contraria, para los niveles de STAT3, la línea HCT116 presenta menores niveles relativos de ARNm que la otra línea de cáncer HT29 y la línea CCD841 sigue presentando niveles bajos en comparación con las de cáncer (Figura 12B).



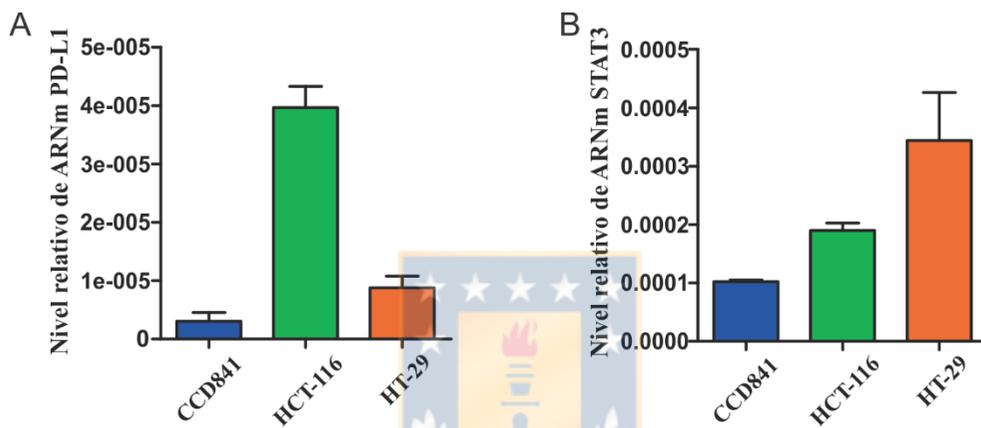


Figura 12: Niveles relativos de ARNm de moléculas inmuno-estimuladoras en líneas celulares de colon CCD841 y cáncer colorrectal HCT116 y HT29. (A) Niveles relativos de ARNm para PD-L1 (B) Niveles relativos de ARNm para STAT3. Representación corresponde a tres experimentos independientes.

1.2.2 Cuantificación relativa de la expresión de genes inmunostimuladores luego del tratamiento con inhibidor de HDAC6.

1.2.2.1 Cuantificación relativa de expresión del gen *PD-L1*.

Los resultados de la estimación de los niveles de expresión relativa del gen *PD-L1* utilizando PCR en tiempo real luego del tratamiento con 1 uM de Nexturastat A en las tres líneas celulares de colon mostraron que los niveles de ARNm no presentan cambios significativos en la línea celular CCD841 en ningún tiempo de incubación con Nexturastat A en comparación con el control sin tratamiento (Figura 13A).

En cambio, ambas líneas celulares de cáncer de colon HT29 y HCT116 muestran una disminución de la expresión de PD-L1 dependiente del tiempo luego del tratamiento con Nexturastat A (Figura 13 B y C).

Para la línea celular de adenocarcinoma HT29 se observa que esta disminución de los niveles relativos de ARNm es significativa a partir de las 8 horas de incubación con el inhibidor (Figura 13B), mientras que en la línea celular de carcinoma HCT116, es significativo a partir de las 2 horas de incubación con Nexturastat A (Figura 13C).

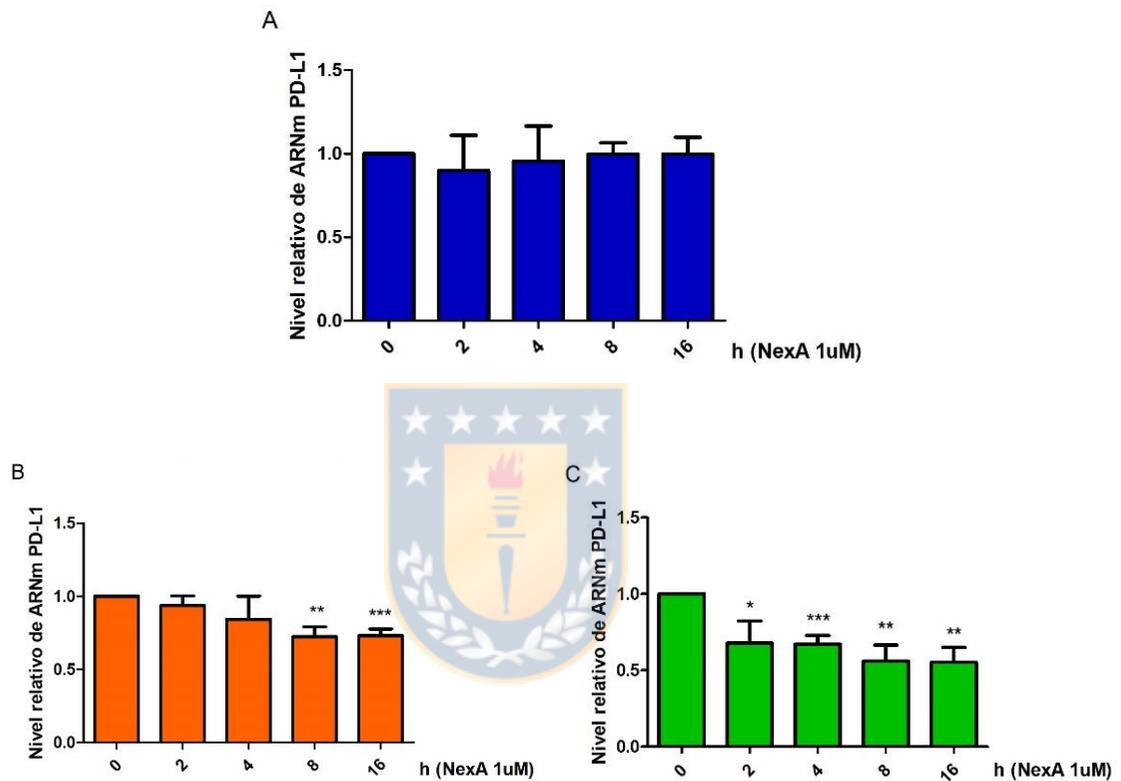


Figura 13: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de PD-L1 con Nexturastat A 1uM. Cuantificación relativa de ARNm de PD-L1 luego del tratamiento con 1uM de Nexturastat A a diferentes tiempos de exposición en líneas celulares CCD841 (A), HT29 (B) y HCT116(C). Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico por t-Student (valores de significancia * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). La cuantificación relativa de expresión de *PD-L1* se calculó usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ con *18S* como gen de referencia.

Para evaluar si la concentración utilizada del inhibidor afecta la expresión relativa de ARNm de PD-L1 se utilizó una concentración de 5uM de Nexturastat A, en las mismas condiciones que los ensayos anteriores de tiempo.

Para lo cual se obtuvo que en la línea celular CCD841 se vuelve a observar que no hay efectos significativos en la expresión relativa del mensajero en comparación con el control sin tratamiento (Figura 14A). La misma tendencia de disminución dependiente del tiempo se observan para las dos líneas celulares de cáncer de colon (Figuras 14B y C). La expresión relativa de PD-L1 en la línea celular HT29 ahora se ve significativamente disminuida a partir de las 4 horas de exposición al inhibidor frente al control sin tratamiento (Figura 14B), mientras que en la línea celular HCT116 la disminución significativa en los niveles relativos de ARNm nuevamente ocurre a partir de las 2 horas de incubación.

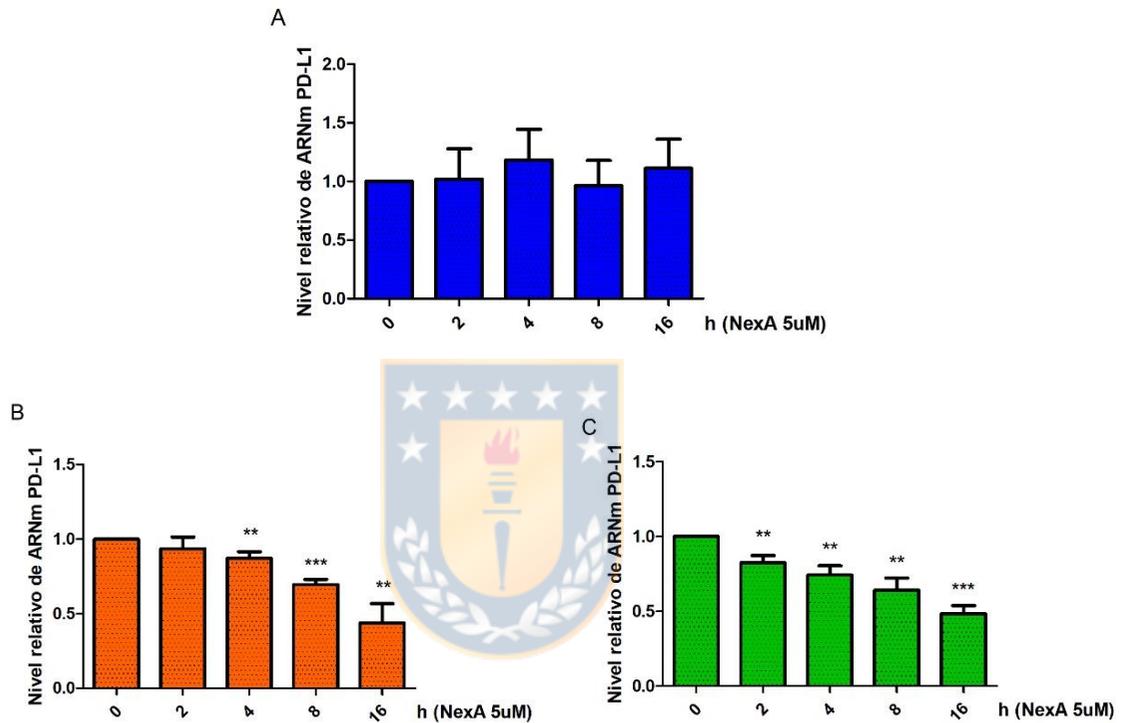
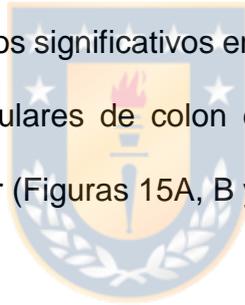


Figura 14: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de PD-L1 con Nexturastat A 5uM. Cuantificación relativa de ARNm de PD-L1 luego del tratamiento con 5uM de Nexturastat A a diferentes tiempos de exposición en líneas celulares CCD841 (A), HT29 (B) y HCT116(C). Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico por t-Student (valores de significancia * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). La cuantificación relativa de expresión de *PD-L1* se calculó usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ con *18S* como gen de referencia.

1.2.2.2 Cuantificación relativa de expresión de *STAT3*.

Paralela a la evaluación de la expresión transcripcional de PD-L1, se analizó la expresión del gen *STAT3* para indagar cual es el efecto del inhibidor de HDAC6 frente al factor de transcripción que participa en la expresión de PD-L1. Se utilizaron las mismas concentraciones y condiciones de tiempo descritas anteriormente.

Los resultados muestran que el tratamiento con Nexturastat A 1uM a distintos tiempos no producen efectos significativos en los niveles de ARNm de *STAT3* en ninguna de las líneas celulares de colon en comparación con el control sin tratamiento con el inhibidor (Figuras 15A, B y C).



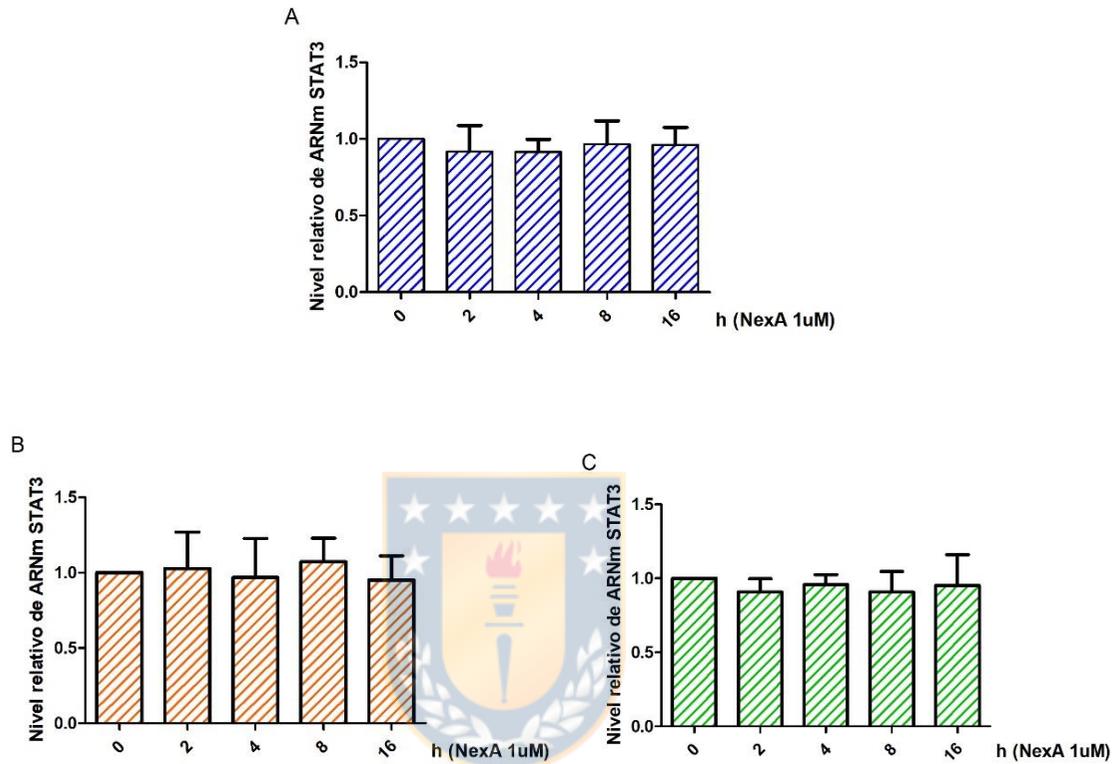


Figura 15: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de STAT3 con Nexturastat A 1uM. Cuantificación relativa de ARNm de STAT3 luego del tratamiento con 1uM de Nexturastat A a diferentes tiempos de exposición en líneas celulares CCD841 (A), HT29 (B) y HCT116(C). Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico por t-Student (valores de significancia * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). La cuantificación relativa de expresión de *STAT3* se calculó usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ con *18S* como gen de referencia.

Similar a lo realizado para la cuantificación relativa de PD-L1, se evaluó el efecto al aumentar la concentración del inhibidor de HDAC6 a 5uM para ver la dependencia que tiene en la expresión de PD-L1.

Los resultados evidencian un leve aumento en los niveles relativos del mensajero de STAT3 en la línea celular CCD841 dependiente del tiempo de exposición al inhibidor, sin embargo, este aumento solo es significativo a las 4 horas frente al control sin tratamiento (Figura 16A).

Para las líneas celulares de cáncer de colon los niveles relativos de ARNm de STAT3 se mantienen constantes a través del tiempo (Figura 16B y C). Solo en la línea celular HT29 se muestra un aumento significativo al máximo tiempo estudiado de 16 horas en comparación con el control sin tratamiento (Figura 16B).

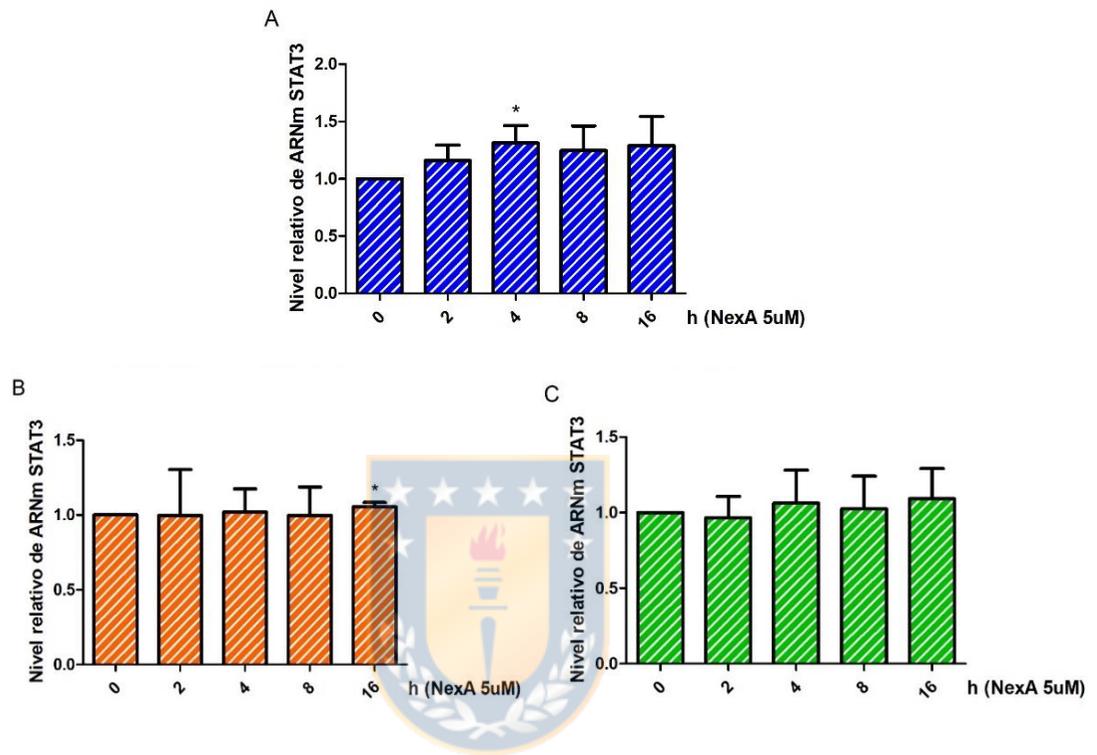
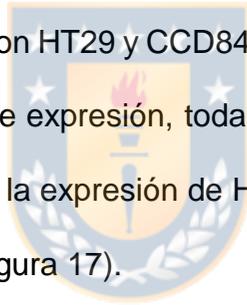


Figura 16: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de STAT3 con Nexturastat A 5uM. Cuantificación relativa de ARNm de STAT3 luego del tratamiento con 5uM de Nexturastat A a diferentes tiempos de exposición en líneas celulares CCD841 (A), HT29 (B) y HCT116 (C). Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico por t-Student (valores de significancia * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). La cuantificación relativa de expresión de *STAT3* se calculó usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ con *18S* como gen de referencia.

1.2.3 Expresión basal de proteínas inmuno-estimuladoras.

De forma similar a los niveles de expresión basal de ARNm, se estableció la expresión de proteína para las moléculas inmuno-estimuladoras PD-L1 y STAT3 en las tres líneas celulares antes de ser sometidas a tratamiento con el inhibidor con el fin de poder establecer la expresión diferencial luego del tratamiento con Nexturastat A en las distintas condiciones estudiadas.

En los resultados se observa una mayor expresión de PD-L1 y STAT3 en la línea HCT116 en comparación con HT29 y CCD841. Sin embargo, se puede confirmar que pese a su diferencia de expresión, todas las líneas celulares expresan PD-L1 y STAT3, y se confirma la expresión de HDAC6, importante para la actividad del inhibidor en estudio (Figura 17).



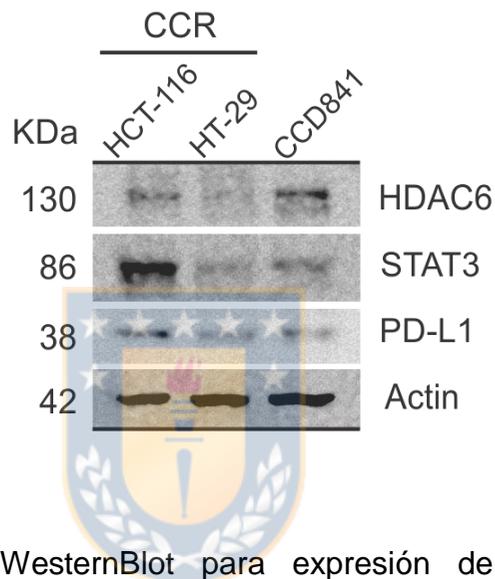


Figura 17: Análisis WesternBlot para expresión de moléculas inmunoestimuladoras sin tratamiento con inhibidor de HDAC6. Los resultados corresponden a un experimento.

1.2.4 Detección diferencial de la expresión de las moléculas inmunostimuladoras después del tratamiento con inhibidor de HDAC6.

Para estudiar la expresión de PD-L1 y STAT3 luego del tratamiento con Nexturastat A se analizó mediante WesternBlot los extractos totales de proteínas de las tres líneas celulares utilizadas. Los análisis se realizaron con una concentración de 5uM de inhibidor ya que en el estudio previo de niveles relativos de ARNm se observa una mayor variación en comparación con la concentración de 1uM.

Se detectó la expresión de HDAC6 para verificar que la utilización del inhibidor no afecta su expresión en las diferentes condiciones de tratamiento y se utilizó actina como control de carga para asegurar que la cantidad de proteína total analizadas es la misma en todas las condiciones estudiadas.

Los resultados indican que frente al tratamiento con el inhibidor la expresión de PDL1 disminuye de forma dependiente del tiempo en ambas líneas celulares de cáncer colorrectal, sin embargo, esta disminución es más notoria a partir de las 4 horas de exposición al inhibidor en la línea celular HCT116 (Figura 18A), mientras que en la línea HT29 solo se observa una disminución a las 16 horas de tratamiento con Nexturastat A (Figura 18B).

Con respecto a la expresión de STAT3, se observa que no cambia con las horas de tratamiento en ninguna de las dos líneas celulares de cáncer colorrectal (Figura 18 A y B).



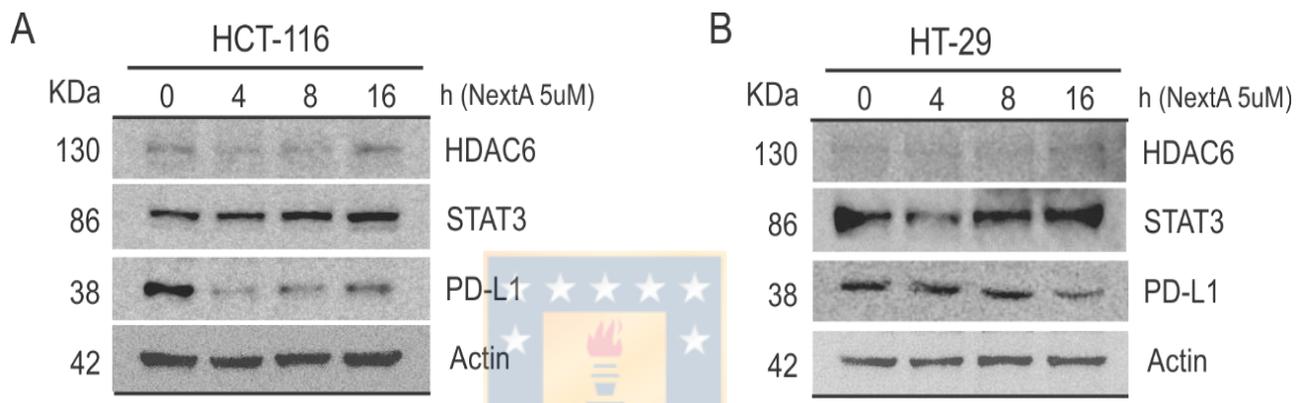


Figura 18: Detección de proteína mediante Western Blot para líneas celulares de cáncer colorrectal a distintos tiempos de tratamiento con 5uM de inhibidor HDAC6. Líneas celulares de cáncer colorrectal (A) HCT116 (B) HT29. Los resultados corresponden a un experimento.

1.3 Identificar sitios de unión para el factor de transcripción STAT3 en la región promotora del gen PD-L1.

1.3.1 Análisis *in silico* del promotor del gen *PD-L1*.

Con el fin de analizar una potencial regulación transcripcional de PD-L1 por efectos del factor de transcripción STAT3, se obtuvo la secuencia nucleotídica del promotor para PD-L1 de humano y ratón desde la base de datos Eukariotic Promoter Database. Estas secuencias fueron alineadas utilizando el servidor ClustalW, con la finalidad de dilucidar la homología entre ambas secuencias. Luego se realizó una búsqueda de los sitios de unión para el factor de transcripción STAT3 en 700 pares de bases de la región promotora desde la posición -1 del gen *PD-L1* mediante un programa de búsqueda de sitios de unión para factores de transcripción disponibles online, TFBind (Figura 19).

Human	-----gggtggcagaatatcaggacacctgagcat	30
Mouse	ttcgggtcctcattaccataataaatgcagtgatggccatttctgagacctagccct	60
	* * * * * * * * * *	
Human	tcttaaaa-gatg-----tagctcgggatgggaagtcttttaaatgacaaa	75
Mouse	ggcagcagggcgcggtatgggatccctggaccacgctggcggctagtttgccagctg	120
	* * * * * * * * * *	
Human	g-caaatgaagtttcattatgtcgaggaac tttgaggaa -----gtcacag	120
Mouse	cgagcccaggttaggtaagagagaccctc tttcaaaaa caaggtgggagct gttaggg	180
	** ** * * * * * * * * *	
Human	aatccacgatttaaaaatatatttctattatacacaccatacacacacacacacactac	180
Mouse	aa ggcaacctatg---tggatctccaagcacacgctcccc---cccccccccccc	232
	** * * * * * * * * * *	
Human	ttctfaga ataaaaa-ccaaagccat-----atgggtctgctgctgactttttata	230
Mouse	gacctcaggttccactcccacccaaaatagagctgagttgtttactctggactgtttct t	292
	** * * * * * * * * * *	
Human	tgttgtagagtatatcaagttatgtcaagatgttcagtcacctgaagaggt ttatc	290
Mouse	tgaggaa ctgat-----	307
	** * * * * *	
Human	agaaa gggggacgct ttctgataa aggttaagggtaaccttaagctcttaccctctg	350
Mouse	----- ttacaagaa -----agctaatgcaggtttc	331
	* * * * * * * * * *	
Human	aaggtaaaatcaaggtgcgttcagatggtggctgttgtaaattcttttttattaata	410
Mouse	actttcacttttagtttcgtttttaaat-----agtgtttgtttgtttttttatcg	386
	* * * * * * * * * *	
Human	acatactaaatgtggattgttcttaaatcttc-----gaaactcttccc	453
Mouse	acagcctctcagtagcagcccgggtgtcttggagctctctctatagaccagagactacc	446
	*** ** * * * * * * * * *	
Human	ggtgaaaatctcat-- ttacaagaa aa-----ctggactgacatgtttc	495
Mouse	tgccactggctcctg gtactggaa taaggcgtgtgtcaccgcaccgaagcctagtttc	506
	* * * * * * * * * *	
Human	actttctgtttcatt--tctatacacagcttta ttcctagga accaaacactagatacc	552
Mouse	gtttttcttaaacgtgaatatcccaaagctgactctaaagtcatccgaggaataact	566
	*** * * * * * * * * *	
Human	taaactgaaagcttcgccgat ttcaccgaa ggtcaggaaagtccaacgccggcaact	612
Mouse	atgagataaaa-----ctcatgctca-----aagggactgggt	598
	* * * * * * * * * *	
Human	ggatttgctgccttgggca gaggtggg gggaacccgcctccggcctggcgc--aacgc	670
Mouse	ggcttcggtttcacagacagcggaggt-tggacaaggcttc gaggagtgg gcggggctc	657
	** * * * * * * * * * *	
Human	tgagcagc-----tggcgcgtcccgcggggccccAGTTCTGCGCAGCTTCCCAGGGCTCC	725
Mouse	tgaactcgagataagaccaggaatcgtggtcccaagcctcATGCCAGGCTGCACTGC	717
	*** * * * * * * * * *	
Human	GCACCAGCCGCGCTTCTGTCCGCCTGCAGGTAGGGAGCGTTGTTCCCTCCGC-GGGTGCCC	784
Mouse	ACGTCGCGGGCCAGTCTCCTCGCCTGCAGGTAAGGGAGCATCTTCTCGCGGAATCCGCTT	777
	* * * * * * * * * *	

Figura 19: Alineamiento de región promotora del gen de *PD-L1* de humano y ratón. En color verde se destacan los sitios de unión de STAT3 para humano y ratón. En color amarillo se señala GC-box para ambas especies.

Se lograron encontrar varios sitios de unión para el factor STAT3 con una secuencia consenso TTCCCRKAA, donde R puede ser A o G y K puede ser G o T, los cuales fueron marcados en la secuencia promotora analizada (Figura 20). En base a ellos, se generaron oligonucleótidos para un análisis posterior de estos sitios de unión mediante un ensayo de unión ADN-proteína mediante Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Los oligonucleótidos generados flanquean 5 de los sitios de unión para STAT3 encontrados y se disponen según la Figura 17 para generar fragmentos de 127, 133, 129pb para la región proximal del promotor y 171pb para la región distal, la cual abarca dos sitios de unión.



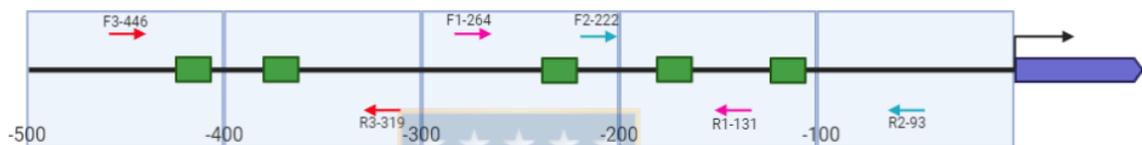


Figura 21: Esquema representativo de oligonucleótidos generados para análisis de sitio de unión de STAT3 en región promotora de PD-L1. En verde se encuentran los 5 sitios de unión de STAT3 a analizar. Las fechas indican los oligonucleótidos generados con sus respectivos nombres según tabla III.

Los oligonucleótidos generados (Tabla III) fueron estandarizados a diferentes temperaturas y se combinaron para generar fragmentos en regiones distales y proximales del promotor de PD-L1. La combinación con los oligonucleótidos F3-446/R3-319 genera fragmentos en la región distal dentro del promotor de PD-L1 abarcando dos sitios de unión a STAT3, mientras que la combinación de F1-264/R1-131, F2-222/R2-93 y F1-264/R2-93 generan fragmentos en la región proximal del promotor, y esta última abarca tres sitios de unión a STAT3.

En la optimización mediante PCR convencional se utilizó ADN genómico y cromatina sonicada de células humanas (HEK-293), ya disponible en el laboratorio, para estandarizar el comportamiento de esta región del genoma ante el proceso de fraccionamiento de este, así anticipar el análisis previo a células de cáncer colorrectal, esto se realizó a tres temperaturas diferentes (50°C, 55°C y 60°C) de alineamiento (Figura 22). Al comparar las distintas temperaturas, se observa que a 55 y 60°C presenta mejor amplificación de las regiones a analizar.

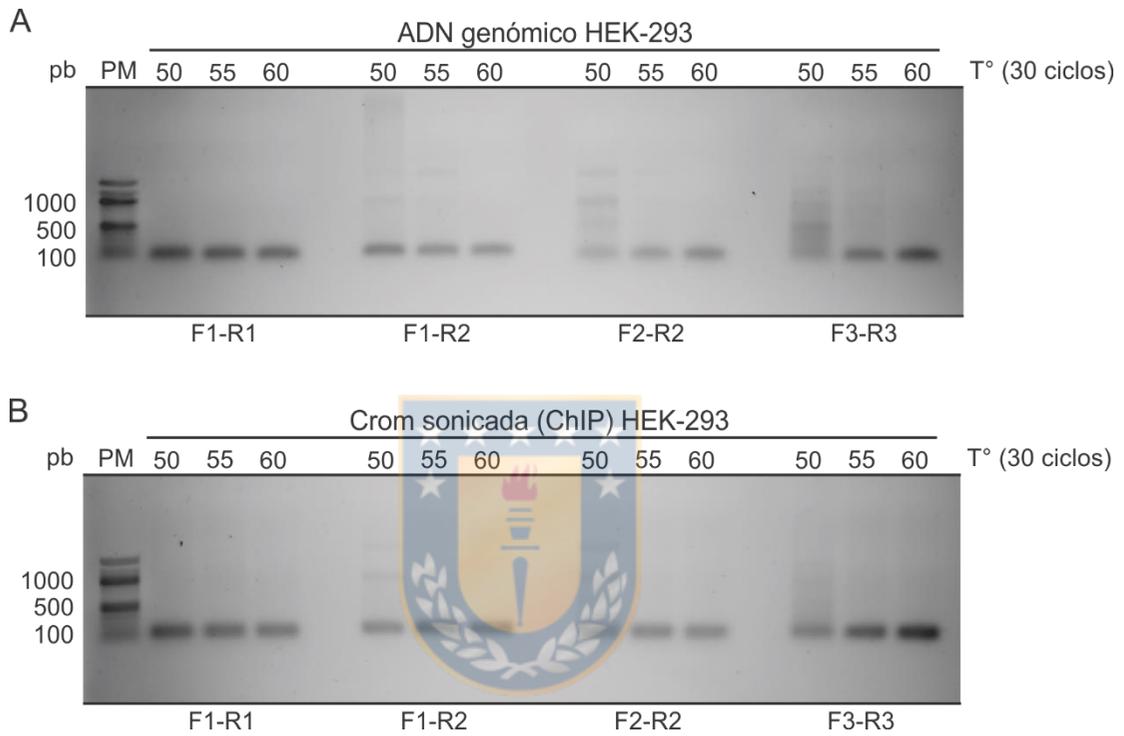


Figura 22: Estandarización de oligonucleótidos para sitios de unión a STAT3. Ensayo PCR convencional a tres temperaturas distintas de alineamiento. Fragmentos generados son visualizados en gel de agarosa a 1%. Línea celular HEK-293 (A) ADN genómico (B) Cromatina sonicada.

7 DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal es una enfermedad que afecta a un gran número de personas a nivel mundial y nacional. Solo en la región del Biobío el cáncer colorrectal se posiciona en el tercer lugar dentro de los cánceres con mayor incidencia. A pesar de que existen diferentes tratamientos, estos conllevan diversos efectos adversos y/o pueden no ser del todo satisfactorios, es por esto que tratamientos alternativos o complementarios a los actuales están en constante búsqueda. Dentro de estos, la propuesta de utilizar tratamientos combinados de inmunoterapia con moduladores epigenéticos como inhibidores de histonas deacetilasas (HDACinh) es una atractiva alternativa contra el cáncer colorrectal ya que se ha demostrado que pueden actuar de manera selectiva en las células cancerosas provocando detención de la proliferación celular o inducción de la apoptosis mediante la regulación de la acetilación de histonas y proteínas no histónicas (Aztopal et al., 2018; Bolden, Peart, & Johnstone, 2006; Gilardini Montani et al., 2017) incluidos diferentes modelos de cáncer colorrectal (Dai et al., 2019; Sohaib & Ezhilarasan, 2020).

Varios tipos de cáncer expresan PD-L1 en la membrana de células tumorales suprimiendo la actividad de células T del sistema inmune como un mecanismo de evasión. Esta proteína ya es blanco terapéutico contra algunos tipos de cáncer (Topalian, Drake, & Pardoll, 2015) y evidencia muestra que esta proteína

se encuentra regulada indirectamente por acción de HDAC6 sobre el factor de transcripción STAT3 en varios tipos de cáncer, por ello indagar en los efectos y mecanismos de acción de los inhibidores de Histonas Deacetilasa es de gran importancia, y se aborda en esta investigación.

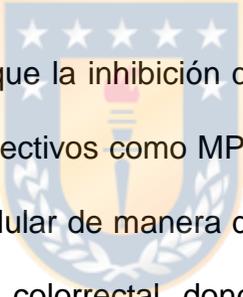
En el presente estudio se investigó como la inhibición de HDAC6 mediante el uso de Nexturastat A, un inhibidor selectivo, modula la expresión de PD-L1 en modelos celulares de cáncer colorrectal, y además se exploró el rol de HDAC6 en la actividad del factor de transcripción STAT3 sobre la expresión de PD-L1.

Los resultados de esta investigación revelaron que el efecto de Nexturastat A dependen del contexto celular. En ensayos exploratorios de viabilidad e inducción de la apoptosis, se observó que el tratamiento con Nexturastat A afecta de manera dosis dependiente a las líneas celulares de cáncer colorrectal. A concentraciones altas de tratamiento se observó una notoria disminución de la viabilidad en los dos modelos celulares de cáncer colorrectal de aproximadamente 40%, y muy bajo efecto sobre células de colon normales, manteniendo la viabilidad en aproximadamente 70%. A concentraciones bajas de inhibidor esta disminución fue de solo el 80% aproximadamente para las tres líneas celulares en comparación con un inhibidor de HDAC de amplio espectro que disminuyo la viabilidad en un 50% aproximadamente.

Previamente, se ha reportado que los inhibidores de histonas deacetilasas afectan la sobrevivencia de células tumorales (Bolden et al., 2006). Los hallazgos obtenidos en esta investigación concuerdan con lo reportado en literatura, dónde se evidencia la potente actividad contra células de cáncer que ejerce Panobinostat (Chao et al., 2013; Edwards, Li, Atadja, Bhalla, & Haura, 2007; Helland et al., 2016; Mehdi et al., 2012; G. Qin et al., 2019), incluidos estudios en células de cáncer colorrectal *in vitro* (Shao et al., 2008) en contraste con el menor efecto de Nexturastat A. A pesar de esto, el inhibidor Nexturastat A ha mostrado generar un aumento en la inducción de apoptosis en células de mieloma y cáncer de ovario (Moufarrij et al., 2020; Sun et al., 2019; Wilson et al., 2013), esto sugiere que la inhibición selectiva de HDAC6 provocaría cambios epigenéticos limitados y controlados, ya que es una deacetilasa predominantemente citoplasmática, afectando a proteínas que regulan funciones de adhesión, ciclo celular, estabilización y degradación de proteínas entre otras, en comparación con un inhibidor de alto espectro que afecta a múltiples vías de señalización a la vez, desregulando los estados de acetilación y deacetilación mayoritariamente de histonas (T. Li et al., 2018).

En relación a los modelo celulares de cáncer colorrectal, la línea HCT116 mostró ser más sensible al tratamiento con Nexturastat A observándose una disminución de la viabilidad de un 20%, y aumento de la apoptosis de 0,5 veces en comparación con las otras dos líneas. Esto puede ser respuesta a que esta línea

celular de carcinoma colorrectal no presenta alteraciones en las vías de p53, vía encargada de regular la apoptosis en células dañadas. En cambio, la línea celular HT29 presenta una mejor tolerancia ante este tratamiento, lo cual se puede deber a una mutación del gen p53 (Ahmed et al., 2013). Previamente, se ha documentado que la inactivación de HDAC6 en células de carcinoma hepatocelular previene la degradación de p53 por poliubiquitinación (Ding et al., 2013), eso sugiere que su inhibición podría estar relacionada con la baja viabilidad obtenida en los modelos celulares de cáncer de colon.



También se ha reportado que la inhibición de HDAC6 con otros inhibidores de deacetilasa de histonas selectivos como MPT0G612, Tubastatin A y ACY-1215 disminuyen la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración en líneas celulares de cáncer colorrectal, donde se observa que la línea celular HCT116 es más sensible a los tres inhibidores descritos al igual que en los resultados de este trabajo (M. C. Chen, Lin, Liao, Liou, & Chen, 2019). Sin embargo, la disminución de la viabilidad no predice el destino final de la célula. Para confirmar esto último sería necesario complementar nuestros ensayos analizando la expresión de proteínas apoptóticas frente al tratamiento con Nexturastat A.

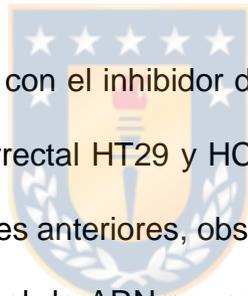
En relación a la expresión de PD-L1, se ha informado previamente que la inhibición de HDAC6 puede modular la expresión de esta proteína en varios

modelos de cáncer mediante el factor de transcripción STAT3 (Keremu et al., 2019; Lienlaf et al., 2016). Por ello investigamos mediante RT-qPCR y WesternBlot si en nuestro modelo esto ocurre de forma similar.

Primero, nuestros resultados sobre la expresión de PD-L1 en las tres líneas celulares en condiciones basales, previas al tratamiento con inhibidor demostraron que existe expresión basal de PD-L1 a nivel de ARNm y proteína. Esto concuerda con otros estudios previos dónde se muestra la alta expresión de esta molécula inmuno-estimuladora en varios tipos de cáncer (X. Wang, Teng, Kong, & Yu, 2016). En conjunto con esto, datos obtenidos de The Human Protein Atlas también reportan expresión de PD-L1 en células de colon y recto. Se observa que los niveles de ARNm y proteína de PD-L1 son más altos en la línea celular de carcinoma colorrectal HCT116 ya que esta línea se clasifica como CCR con MSI los que se han descrito con una sobreexpresión de proteínas de control inmunitario, en especial PD-L1 (Ahmed et al., 2013; Llosa et al., 2015).

En conjunto con lo anterior, se comprueba también la presencia de STAT3 en las tres líneas celulares. Los niveles relativos de ARNm son más altos en las líneas de cáncer colorrectal doblado la cantidad en el caso de la línea HCT116 y casi el cuádruple en HT29 en comparación con la línea de colon normal ya que se sabe que STAT3 es un factor de transcripción que se activa constitutivamente en una amplia variedad de cáncer, incluido en cáncer colorrectal (Klampfer,

2008). A diferencia de PD-L1 la expresión de STAT3 a nivel de ARNm es más alta en la línea HT-29 y se observa una mayor expresión nivel de proteína en la línea HCT-116. Sin embargo, la tasa de traducción en cada línea celular puede ser diferente por lo que ambas líneas celulares no pueden ser comparadas, y la expresión de proteínas en ambos casos, solo es una aproximación, además se debe realizar una cuantificación normalizada de la expresión en condiciones sin tratamiento con Nexturastat y como se mencionó anteriormente, solo se puede afirmar que las líneas en estudio expresan ambos genes de interés.



Luego de los tratamientos con el inhibidor de HDAC6, se pudo comprobar que en células de cáncer colorrectal HT29 y HCT116 existe una correlación con lo publicado en investigaciones anteriores, observando una notoria disminución de los niveles de PD-L1 a nivel de ARNm y proteína de forma dependiente de la concentración y el tiempo de tratamiento utilizado, mientras que en células CCD841 no se observó efectos en los niveles de PD-L1. Se pudo observar también que los niveles de STAT3 como ARNm y proteína no son alterados bajo la inhibición de HDAC6 en ninguna de las condiciones analizadas, resultados que también se observaron en la eliminación genética de HDAC6 en modelos de melanoma y osteosarcomas, respaldando que HDAC6 es capaz de modular la expresión de PD-L1 indirectamente (Keremu et al., 2019).

El rol de HDAC6 en la regulación de la vía STAT3 se ha informado anteriormente en células APCs y células de melanoma (Cheng, Lienlaf, Wang, et al., 2014; Lienlaf et al., 2016). Aunque el mecanismo regulador exacto no se comprende completamente, se ha demostrado que la eliminación genética y la inhibición farmacológica de HDAC6 disminuirían la fosforilación de STAT3, afectando la expresión genética de varios blancos del factor de transcripción, incluidos PD-L1. Como se mencionó anteriormente, los niveles de ARNm de STAT3 no fueron afectados a ninguna concentración ni tiempo de tratamiento estudiado, esto sugiere y respalda que la inhibición de HDAC6 solo podría afectar la funcionalidad de este factor de transcripción y no su expresión. Sin embargo, queda pendiente analizar en profundidad las modificaciones covalentes que sufre este factor de transcripción, principalmente, en su forma activada por fosforilación.

Al realizar un análisis *in silico* de la región promotora de PD-L1 se hallaron varios sitios de unión para STAT3, afirmando que este podría estar participando en la cascada de señalización de PD-L1. Sin embargo, STAT3 solo puede activar la transcripción de sus genes diana al ser reclutado al promotor si es fosforilado y activado previamente (Fang et al., 2014; Fujita et al., 2015; Lienlaf et al., 2016). El reclutamiento de STAT3 a los sitios de unión encontrados en el promotor de PD-L1 no fueron analizados en este trabajo, pero la estandarización de los oligonucleótidos generados mostraron que si existe una amplificación de estas

regiones en cromatina sonicada de células HEK-293, lo que genera la posibilidad de reproducir este ensayo de forma efectiva con cromatina sonicada de líneas celulares de cáncer colorrectal y posteriormente determinar la unión de STAT3 a dichos sitios putativos bajo las condiciones de tratamiento con inhibidor de HDAC6.



8 CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.

Los resultados de esta tesis apuntan a que el efecto que produce la inhibición selectiva de HDAC6 es capaz de inducir apoptosis y disminuir la viabilidad celular de ambos modelos de cáncer colorrectal estudiados, en comparación con el modelo de células normales de colon. Sin embargo, la eficacia de esto depende del contexto celular, de la dosis y el tiempo de tratamiento. Para comprender mejor el efecto en la viabilidad celular hace falta analizar el efecto de otros inhibidores de HDAC6 en estos mismos modelos celulares, estudiar el comportamiento en la expresión de PD-L1 luego de la suspensión de la dosis de inhibidor y analizar la expresión de proteínas apoptóticas frente al tratamiento.

La inhibición de HDAC6 demostró disminuir la expresión de PD-L1 en ambos modelos, y confirmó la hipótesis de que HDAC6 está involucrado en la regulación transcripcional de PD-L1.

Para lograr dilucidar mejor el mecanismo de acción de HDAC6 en la expresión de PD-L1 y su rol en la activación de STAT3 hace falta realizar ensayos dónde se evidencie que la activación de STAT3, ya sea por presencia de acetilación en el residuo 685 y/o fosforilaciones específicas en los residuos 705 y 727, que se pueden ver afectadas por la inhibición de HDAC6 y si esto impide que STAT3 se una a la región promotora de PD-L1. Sin embargo, ya se realizó un análisis previo

de la región promotora para definir los posibles sitios de unión para STAT3, con lo que se definió y se testeó las regiones promotoras que se analizaran mediante qPCR para posteriormente realizar un ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el factor de transcripción STAT3.

Pese a que quedan muchas incógnitas sobre el mecanismo por el cual se regula la expresión de PD-L1, nuestros resultados sugieren que el uso de inhibidores selectivos de HDACs, como es el efecto de la inhibición de HDAC6, nos podría permitir considerarlo como un agente antitumoral en el cáncer colorrectal y su uso complementario como coadyuvante de las inmunoterapias dirigidas a los puntos de control inmunitario, al regular negativamente la expresión de PD-L1. Por lo cual, seguir investigando sobre este receptor y el efecto que generaría la inhibición de HDAC6 en un modelo *in vivo* que permita observar las interacciones celulares entre células cancerígenas y células del sistema inmune es de gran importancia, permitiendo llegar a futuros tratamientos dirigidos y efectivos contra el cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer.

9 GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCs	Células presentadoras de Antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CCR	Cáncer Colorrectal
ChIP	Inmunoprecipitación de Cromatina
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Di-Metil sulfoxido
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
HAT	Histona acetil transferasa
HDAC	Histona deacetilasa
HDACinh	Inhibidor de histona deacetilasa
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HRP	Peroxidasa de rábano
IL	Interleucina
IP	Ioduro de Propidio
JAK	Janus Kinasa
miRNA	micro ARN
NextA	Nexturtastat A

PAF	Poliposis Adenomatosa Familiar
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCI	Puntos de control Inmunitario
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PD-L1	Ligando de proteína de muerte celular programada 1
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RT-PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa en tiempo real
RT-q PCR	Reacción cuantitativa en Cadena de Polimerasa en tiempo real
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOC	Suppressor of cytokine signalling
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBST	tris-buffered saline and Polysorbate 20
XTT	Sal de tetrazolio

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhamed, S., Ogura, K., Yokoyama, S., Saiki, I., & Hayakawa, Y. (2016). AKT-STAT3 pathway as a downstream target of egfr signaling to regulate PD-11 expression on NSCLC cells. *Journal of Cancer*, 7(12), 1579–1586. <https://doi.org/10.7150/jca.14713>
- Afanador A, C. H., & Muñeton P, C. M. (2018). Epigenetics of Colorectal Cancer. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 33, 30–37. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22516/25007440.229> Epigenetics
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., ... Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487–500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- Aztopal, N., Erkisa, M., Erturk, E., Ulukaya, E., Tokullugil, A. H., & Ari, F. (2018). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, 280, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.003>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(9), 769–784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>
- Byun, D. J., Wolchok, J. D., Rosenberg, L. M., & Girotra, M. (2017). Cancer immunotherapy — immune checkpoint blockade and associated endocrinopathies. *Nature Endocrinology*, 13, 195–207. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.205>
- Chao, H., Wang, L., Hao, J., Ni, J., Chang, L., Graham, P. H., ... Li, Y. (2013). Low dose histone deacetylase inhibitor, LBH589, potentiates anticancer effect of docetaxel in epithelial ovarian cancer via PI3K/Akt pathway in vitro. *Cancer Letters*, 329(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.035>
- Chen, L., Fischle, W., Verdin, E., & Greene, W. C. (2001). Duration of Nuclear NF- κ B Action Regulated by Reversible Acetylation. *Science*, 293(August), 1653–1658. <https://doi.org/10.1126/science.1062374>
- Chen, M. C., Lin, Y. C., Liao, Y. H., Liou, J. P., & Chen, C. H. (2019). MPT0G612, a novel HDAC6 inhibitor, induces apoptosis and suppresses ifn- γ -induced programmed death-ligand 1 in human colorectal carcinoma cells. *Cancers*, 11(10), 1617. <https://doi.org/10.3390/cancers11101617>
- Cheng, F., Lienlaf, M., Perez-villarroel, P., Wang, H., Lee, C., Woan, K., ...

- Villagra, A. (2014). Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells. *Molecular Immunology*, 60(1), 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.02.019>
- Cheng, F., Lienlaf, M., Wang, H.-W., Perez-Villarroel, P., Lee, C., Woan, K., ... Sotomayor, E. M. (2014). A Novel Role for Histone Deacetylase 6 in the Regulation of the Tolerogenic STAT3/IL-10 Pathway in APCs. *The Journal of Immunology*, 193(6), 2850–2862. <https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2011.09.010>
- Chung, Y. C., & Chang, Y. F. (2003). Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 83(4), 222–226. <https://doi.org/10.1002/jso.10269>
- Coutzac, C., Adam, J., Soularue, E., Collins, M., Racine, A., Mussini, C., ... Chaputa, N. (2017). Colon immune-related adverse events: Anti-CTLA-4 and anti-PD-1 blockade induce distinct immunopathological entities. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(10), 1238–1246. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx081>
- Dai, L., He, G., Zhang, K., Guan, X., Wang, Y., & Zhang, B. (2019). Trichostatin A induces p53-dependent endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells. *Oncology Letters*, 17(1), 660–667. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9641>
- Ding, G., Liu, H. D., Huang, Q., Liang, H. X., Ding, Z. H., Liao, Z. J., & Huang, G. (2013). HDAC6 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting P53 transcriptional activity. *FEBS Letters*, 587(7), 880–886. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.02.001>
- Dyck, L., & Mills, K. H. G. (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European Journal of Immunology*, 47(5), 765–779. <https://doi.org/10.1002/eji.201646875>
- Edwards, A., Li, J., Atadja, P., Bhalla, K., & Haura, E. B. (2007). Effect of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against epidermal growth factor receptor-dependent human lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(9), 2515–2524. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0761>
- Fang, W., Zhang, J., Hong, S., Zhan, J., Chen, N., Qin, T., ... Zhang, L. (2014). EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. *Oncotarget*, 5(23), 12189–12202. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2608>
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., ... Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37(4), 391–400. <https://doi.org/10.1038/ng1531>
- Fujita, Y., Yagishita, S., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Kosaka, N., Takeshita, F., ... Ochiya, T. (2015). The clinical relevance of the miR-197/CKS1B/STAT3-mediated PD-L1 network in chemoresistant non-small-cell lung cancer.

- Molecular Therapy*, 23(4), 717–727. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.10>
- Gilardini Montani, M. S., Granato, M., Santoni, C., Del Porto, P., Merendino, N., D’Orazi, G., ... Cirone, M. (2017). Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. *Cellular Oncology*, 40(2), 167–180. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0314-z>
- GLOBOCAN. (n.d.). Global Cancer Observatory. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Helland, Ø., Popa, M., Bischof, K., Gjertsen, B. T., McCormack, E., & Bjørge, L. (2016). The HDACi panobinostat shows growth inhibition both in vitro and in a bioluminescent orthotopic surgical xenograft model of ovarian cancer. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158208>
- Hubbert, C., Guardiola, A., & Shao, R. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417(May), 455–458. <https://doi.org/10.1038/417455a>
- Instituto Nacional del Cáncer. (n.d.). Tipos de tratamiento del Cáncer. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Isomoto, H. (2009). Epigenetic alterations in cholangiocarcinoma-sustained IL-6/STAT3 signaling in Cholangio- carcinoma due to SOCS3 epigenetic silencing. *Digestion*, 79(SUPPL. 1), 2–8. <https://doi.org/10.1159/000167859>
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12293–12297. <https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>
- Iwai, Yoshiko, Terawaki, S., & Honjo, T. (2005). PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology*, 17(2), 133–144. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh194>
- Jiang, X., Zhou, J., Giobbie-Hurder, A., Wargo, J., & Hodi, F. S. (2013). The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clinical Cancer Research*, 19(3), 598–609. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2731>
- Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., & Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(February), 111–130. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0230-y>
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., & Yao, T. P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, 115(6), 727–738. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00939-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00939-5)
- Keremu, A., Aimaiti, A., Liang, Z., & Zou, X. (2019). Role of the HDAC6 / STAT3

- pathway in regulating PD-L1 expression in osteosarcoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 83(0), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3721-6>
- Klampfer, L. (2008). The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Frontiers in Bioscience*. Front Biosci. <https://doi.org/10.2741/2893>
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J. M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J. T., Nicchitta, C. V., ... Yao, T. P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular Cell*, 18(5), 601–607. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.021>
- Li, P., Huang, T., Zou, Q., Liu, D., Wang, Y., Tan, X., ... Alerts, E. (2019). FGFR2 Promotes Expression of PD-L1 in Colorectal Cancer via the JAK/STAT3 Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 202(10), 3065–3075. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801199>
- Li, T., Zhang, C., Hassan, S., Liu, X., Song, F., Chen, K., ... Yang, J. (2018). Histone deacetylase 6 in cancer. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0654-9>
- Lienlaf, M., Perez-Villarroel, P., Knox, T., Pabon, M., Sahakian, E., Powers, J., ... Villagra, A. (2016). Essential role of HDAC6 in the regulation of PD-L1 in melanoma. *Molecular Oncology*, 10(5), 735–750. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.12.012>
- Liu, Y., Hong, Y., Zhao, Y., Ismail, T. M., Wong, Y. H., & Eu, K. W. (2008). Histone H3 (lys-9) deacetylation is associated with transcriptional silencing of E-cadherin in colorectal cancer cell lines. *Cancer Investigation*, 26(6), 575–582. <https://doi.org/10.1080/07357900701837168>
- Llosa, N. J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E. C., Hechenbleikner, E. M., Taube, J. M., ... Housseau, F. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discovery*, 5(1), 43–51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0863>
- Mariadason, J. M. (2008). HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics*, 3(1), 28–37. <https://doi.org/10.4161/epi.3.1.5736>
- Marks, P. A., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., & Kelly, W. K. (2001). HISTONE DEACETYLASES AND CANCER: CAUSES AND THERAPIES, 1(December), 194–202.
- Mehdi, O., Françoise, S., Sofia, C. L., Urs, G., Kevin, Z., Bernard, S., ... Ali, O. (2012). HDAC gene expression in pancreatic tumor cell lines following treatment with the HDAC inhibitors panobinostat (LBH589) and trichostatine (TSA). *Pancreatology*, 12(2), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.02.013>
- Migheli, F., & Migliore, L. (2012). Epigenetics of colorectal cancer. *Clinical Genetics*, 81, 312–318. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01829.x>
- Moore, J. S., & Aulet, T. H. (2017). Colorectal Cancer Screening. *Surgical Clinics of NA*, 97(3), 487–502. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.01.001>

- Morikawa, T., Baba, Y., Yamauchi, M., Kuchiba, A., Nosho, K., & Shima, K. (2011). STAT3 Expression , Molecular Features , Inflammation Patterns , and Prognosis in a Database of 724 Colorectal Cancers. *Clinical Cancer Research*, 17(6), 1452–1463. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2694>
- Moufarrij, S., Srivastava, A., Gomez, S., Hadley, M., Palmer, E., Austin, P. T., ... Chiappinelli, K. B. (2020). Combining DNMT and HDAC6 inhibitors increases anti-tumor immune signaling and decreases tumor burden in ovarian cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60409-4>
- Narita, T., Weinert, B. T., & Choudhary, C. (2019). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 156–174. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>
- OMS. (2020). Organizacion Mundial de la Salud. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., ... Taylor, J. P. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 447(7146), 859–863. <https://doi.org/10.1038/nature05853>
- Parra, M., & Verdin, E. (2010). Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.004>
- Qin, G., Li, Y., Xu, X., Wang, X., Zhang, K., Tang, Y., ... Deng, W. (2019). Panobinostat (LBH589) inhibits Wnt/ β -catenin signaling pathway via upregulating APC expression in breast cancer. *Cellular Signalling*, 59, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.03.014>
- Qin, S., Xu, L., Yi, M., Yu, S., & Wu, K. (2019). Novel immune checkpoint targets : moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Molecular Cancer*, 18, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12943-019-1091-2>
- Ray, S., Lee, C., Hou, T., Boldogh, I., & Brasier, A. R. (2008). Requirement of histone deacetylase1 (HDAC1) in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) nucleocytoplasmic distribution. *Nucleic Acids Research*, 36(13), 4510–4520. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn419>
- Reich, N. C., & Liu, L. (2006). Tracking STAT nuclear traffic. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), 602–612. <https://doi.org/10.1038/nri1885>
- Sakamoto, K. M., & Aldana-Masangkay, G. I. (2011). The role of HDAC6 in cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/875824>
- Seidel, C., Schnekenburger, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics*, 7(1), 103–118. <https://doi.org/10.2217/epi.14.69>
- Shao, W., Growney, J., Feng, Y., Wang, P., Yan-Neale, Y., O'Connor, G., ... Atadja, P. (2008). Potent anticancer activity of a pan-deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) as a single agent in in vitro and in vivo tumor models. *Cancer Research*, 68(9 Supplement).

- Sharma, S., Poetz, F., Bruer, M., Ly-hartig, T. B. N., Schott, J., Se, B., & Stoecklin, G. (2016). Acetylation-Dependent Control of Global Poly (A) Article Acetylation-Dependent Control of Global Poly (A) RNA Degradation by CBP / p300 and HDAC1 / 2. *Molecular Cell*, 63, 927–938. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.030>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
- Sohaib, M., & Ezhilarasan, D. (2020). Carbamazepine, a Histone Deacetylase Inhibitor Induces Apoptosis in Human Colon Adenocarcinoma Cell Line HT-29. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 51(2), 564–570. <https://doi.org/10.1007/s12029-019-00286-x>
- Sun, X., Xie, Y., Sun, X., Yao, Y., Li, H., Li, Z., ... Xu, K. (2019). The selective HDAC6 inhibitor Nexturastat A induces apoptosis, overcomes drug resistance and inhibits tumor growth in multiple myeloma. *Bioscience Reports*, 39(3), 1–11. <https://doi.org/10.1042/BSR20181916>
- Terranova, M., Thomas, S., & Munster, P. N. (2016). Epigenetic modifiers in immunotherapy: A focus on checkpoint inhibitors. *Immunotherapy*, 8(6), 705–719. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0014>
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015, April 13). Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
- Trengove, M. C., & Ward, A. C. (2013). Proteins in Development and Diseases. *American Journal of Clinical Andf Experimental Immunology*, 2(1), 1–29. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.4739_6.x
- Villagra, A., Sotomayor, E. M., & Seto, E. (2010). Histone deacetylases and the immunological network: Implications in cancer and inflammation. *Oncogene*, 29(2), 157–173. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.334>
- Wang, R., Cherukuri, P., & Luo, J. (2005). Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11528–11534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413930200>
- Wang, X., Teng, F., Kong, L., & Yu, J. (2016, August 12). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105862>
- Wei, N., Li, J., Fang, C., Chang, J., Xirou, V., Syrigos, N., ... Schmitz, J. C. (2019). Targeting colon cancer with the novel STAT3 inhibitor bruceantinol. *Nature Oncogene*, 38(October), 1676–1687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41388-018-0547-y>
- Wilson, P. M., Labonte, M. J., Martin, S. C., Kuwahara, S. T., El-Khoueiry, A., Lenz, H. J., & Ladner, R. D. (2013). Sustained inhibition of deacetylases is required for the antitumor activity of the histone deactylase inhibitors panobinostat and vorinostat in models of colorectal cancer. *Investigational New Drugs*, 31(4), 845–857. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9914-7>
- Wolfle, S. J., Strebovsky, J., Bartz, H., Sahr, A., Arnold, C., Kaiser, C., ... Heeg,

- K. (2011). PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *European Journal of Immunology*, 41(2), 413–424. <https://doi.org/10.1002/eji.201040979>
- Wright, M., Beaty, J., & Ternent, C. (2017). Molecular Markers for Colorectal Cancer. *Surgical Clinics of North America*, 97(3), 683–701. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.01.014>
- Xiong, H., Du, W., Zhang, Y., Hong, J., Su, W., Tang, J., & Wang, Y. (2012). Trichostatin A, a Histone Deacetylase Inhibitor, Suppresses JAK2 / STAT3 Signaling Via Inducing the Promoter-Associated Histone Acetylation of SOCS1 and SOCS3 in Human Colorectal Cancer Cells. *Molecular Carcinogenesis*, 51(2), 174–184. <https://doi.org/10.1002/mc.20777>
- Xiong, H., Zhang, Z. G., Tian, X. Q., Sun, D. F., Liang, Q. C., Zhang, Y. J., ... Fang, J. Y. (2008). Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia*, 10(3), 287–297. <https://doi.org/10.1593/neo.07971>
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*, 9(November), 798–809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>
- Yuan, Z., Guan, Y., Chatterjee, D., & Chin, Y. E. (2005). Stat3 Dimerization Regulated by Reversible Acetylation of a Single Lysine Residue. *Science*, 307, 269–273. <https://doi.org/10.1126/science.1105166>
- Zamani, M., Hosseini, S., & Mokarram, P. (2018). Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects. *Biomarkers*. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2016.1252961>

11 ANEXO

Procedimientos de tratamientos de desechos biológicos y químicos.

La ejecución de este proyecto comprende las siguientes actividades sujetas a consideraciones de Bioseguridad según el “Manual de Normas de Bioseguridad” de CONICYT (2da ed., 2008):

- a) Manipulación de ADN recombinante.
- b) Cultivo de líneas celulares humanas previamente establecidas.
- c) Uso de reactivos tóxicos.

Las actividades que involucran los aspectos arriba mencionados se realizarán en el Laboratorio de Epigenética e Inmunoterapia, a cargo del Dr. Matías Hepp Castro (Investigador Principal), parte Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas del Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción. Este laboratorio posee la experiencia y el equipamiento básico requerido para trabajo con ADN recombinante, sala de cultivo celular debidamente equipadas, para trabajo normal y con virus, así como el manejo de reactivos tóxicos.

Los aspectos de descontaminación, eliminación y transporte de los desechos generados estarán coordinados con la empresa internacional “Stericycle”, según lo que indica el “Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos” de la Universidad y la empresa externa en cuestión (<https://stericyclelatam.com/cl/>).