

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA
“San Vicente Mártir”

Grado en Medicina

Trabajo de Fin de Grado

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE
SURAMINA SOBRE EL GEN PNPT1 EN
CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Autora:

Carla Bretones Ribera

Director:

Dr. Ignacio Ventura González

Valencia, a 18 de abril de 2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera darles las gracias a mis padres, y en especial mención a mi madre, porque han sido un pilar fundamental en mi trayectoria educativa y mis acompañantes en esta decisión que he tomado en mi vida acerca de embarcarme en unos nuevos estudios como son la Medicina.

A mi familia, por su motivación, respeto, admiración y apoyo incondicional durante todos estos años, impulsándome cada día a seguir adelante, sacrificarme y nunca rendirme ni perder el enfoque para conseguir mi sueño: convertirme en una buena médica.

También, agradecer a los que ya no están, los que no habéis podido llegar a ver mi metamorfosis a médico, aunque en el fondo de mi corazón sé que estaréis muy orgullosos de la persona en quién me he convertido. Os llevo cada día en mi pensamiento y estoy segura de que siempre me contempláis desde arriba guiando mi camino de luz.

Por otra parte, quisiera agradecerle al equipo de docentes tan singular y cercano del que he podido disfrutar estos años en la Universidad Católica de Valencia. Por su excelente labor y participación en mi formación y, en particular, al grupo de investigación al cual he estado muy unida durante estos últimos 3 años durante mi beca de colaboración. A mis mentores Ignacio Ventura González, Jesús Ángel Prieto, Fernando y Paco Revert.

Finalmente, agradecer a mis amigas que siempre han estado ahí para apoyarme y abrazar todos mis contratiempos y decisiones, han sabido estar en lo bueno y en lo malo, permitiéndome desconectar de mis estudios y disfrutar de la vida.

Una especial mención a mi pareja, con la que llevo compartiendo casi una década de experiencias, aventuras y desafíos. Los retos nunca nos han frenado y los altibajos siempre nos han fortalecido, porque eres un reflejo de todo lo que quiero llegar ser y todo lo que me detiene para conseguirlo. Pablo cariño, eres mi ejemplo e inspiración.

A todos mi mayor reconocimiento y gratitud. Os quiero mucho.

RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) es una neoplasia primaria del hígado cuya prevalencia y mortalidad es elevada a nivel mundial. Los factores de transcripción SP1 y NF-Y son conocidos por regular la actividad del promotor del gen PNPT1, cuyos niveles elevados se han asociado a una reducción en la esperanza de vida de los pacientes con CHC. PNPT1 codifica para la PNPasa, una translocasa mitocondrial implicada en el transporte de ARN.

En este estudio, empleamos la línea celular de hepatoma humano HepG2 para investigar los efectos del fármaco antipalúdico Suramina en la expresión de PNPT1 y la actividad mitocondrial. Nuestros objetivos incluyeron caracterizar el gen PNPT1 y evaluar los efectos de la Suramina como un posible fármaco reposicionado para el tratamiento del CHC.

Utilizando técnicas de Docking, identificamos compuestos que interactúan con los factores de transcripción del gen PNPT1. Luego, mediante análisis de Kaplan-Meier obtuvimos las curvas de supervivencia y diseñamos las construcciones de mutaciones dirigidas en la secuencia promotora, exploramos la relación entre NF-YA, SP1 y PNPT1. Observamos una correlación entre los niveles de estos factores de transcripción y la expresión de PNPT1, respaldada por ensayos de luciferasa y silenciamiento génico con siARN.

Los estudios in vitro en la línea celular HepG2 revelaron una interacción positiva entre la Suramina y el promotor del gen PNPT1, así como una reducción en la actividad mitocondrial al silenciar NF-YA. Además, la administración de Suramina resultó en un aumento en los niveles de PNPasa, confirmado por ensayos de Western Blot (WB).

El análisis inmunohistoquímico de muestras de pacientes con CHC sugirió una asociación entre la sobreexpresión de NF-YA y SP, la actividad mitocondrial y los niveles de PNPasa en el tejido tumoral.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la Suramina podría modular la sobreexpresión de NF-YA y, por ende, influir en la actividad mitocondrial de las células tumorales hepáticas. Esto ofrece una posible vía para el tratamiento del CHC mediante el reposicionamiento de la Suramina, un antiguo antipalúdico.

Palabras clave: Carcinoma hepatocelular, NF-YA, Sp1, PNPT1, PNPasa, Suramina, actividad mitocondrial.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most prevalent primary liver neoplasm worldwide and constitutes a significant cause of cancer mortality. Transcription factors SP1 and NF-Y are known to regulate the activity of the PNPT1 gene promoter, whose elevated levels have been associated with reduced survival in HCC patients. PNPT1 encodes for PNPase, a mitochondrial translocase involved in RNA transport.

In this study, we utilized the human hepatoma cell line HepG2 to investigate the effects of the antimalarial drug suramin on PNPT1 expression and mitochondrial activity. Our objectives included characterizing the PNPT1 gene and evaluating the effects of suramin as a potential repurposed drug for HCC treatment.

Using docking techniques, we identified compounds that interact with the transcription factors of the PNPT1 gene. Subsequently, through Kaplan-Meier analysis and constructions of directed mutations in the promoter sequence, we explored the relationship between NF-YA, SP1, and PNPT1. We observed a correlation between the levels of these transcription factors and PNPT1 expression, supported by luciferase assays and gene silencing with siRNA.

In vitro studies in the HepG2 cell line revealed a positive interaction between suramin and the PNPT1 gene promoter, as well as a reduction in mitochondrial activity upon silencing NF-YA. Additionally, suramin administration resulted in an increase in PNPase levels, confirmed by Western blot assays.

Immunohistochemical analysis of samples from HCC patients suggested an association between NF-YA and SP1 overexpression, mitochondrial activity, and PNPase levels in tumor tissue.

In conclusion, our findings suggest that suramin may modulate NF-YA overexpression and thus influence mitochondrial activity in hepatic tumor cells. This offers a potential avenue for HCC treatment through the repurposing of suramin, an old antimalarial drug.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, NF-YA, SP1, PNPT1, PNPase, Suramin, mitochondrial activity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidencia de hepatocarcinoma. Distribución según el área geográfica y etiología prevalente. ⁸	2
Figura 2: Representación de cómo la incidencia de diversos estresores desencadena la aparición de una hepatitis crónica. Se trata del estadio inicial, el cual evolucionará hasta convertirse en un Carcinoma hepatocelular pasando por el estadio de Cirrosis hepática (estado de cicatrización post-lesión crónica y con función anormal del órgano) ¹¹	3
Figura 3: Ilustración adaptada de la revisión bibliográfica realizada sobre el tema. Esquemáticamente se muestran los factores de riesgo, las vías de señalización y los genes mutados durante el proceso de inflamación y fibrosis que culminan con la aparición de un hepatocarcinoma avanzado. Fuente: Biorender.	4
Figura 4: Clasificación molecular del CHC. Adaptación del esquema que ilustra la correlación entre las distintas subclases moleculares correlaciones, sus características genéticas/genómicas, vías de señalización principales y etiología. ¹⁷	5
Figura 5: Proceso de evolución desde un hígado normal hasta la aparición del CHC pasando por distintas lesiones preneoplásicas. Representación que ilustra las etapas del desarrollo del hepatocarcinoma y muestra cortes histológicos de pacientes en cada estadio, visualizados al microscopio mediante tinción de hematoxilina. ¹⁸	6
Figura 6: Historia natural tanto de las lesiones precancerosas como del CHC incluyendo las características propias que las diferencian y permiten la subclasificación en foco displásico, nódulo displásico, CHC precoz o progresado. ²⁰	7
Figura 7: Representación gráfica de los diversos biomarcadores utilizados en la actualidad en CHC. Debido a su moderada sensibilidad, pero alta especificidad (A), la AFP es la principal herramienta utilizada tanto para diagnosticar, seleccionar el mejor tipo de tratamiento, así como para determinar la supervivencia y pronóstico (B). ²⁵⁻²⁷ Adaptación de revisión bibliográfica. Fuente: Biorender.....	8
Figura 8: Algoritmo diagnóstico. *Una técnica de imagen solo recomendada en centros con equipos de radiología de alta calidad. ** Características radiológicas del HCC: hipervascularidad arterial y lavado venoso / fase tardía. ²⁸	9
Figura 9: Algoritmo de tratamientos primarios según el estadio del CHC. Fuente: Llovet et al. 2021.	10

Figura 10: Resultados de supervivencia en pacientes con CHC avanzado tras tratamiento sistémico de primera línea. A: Diagrama de red; B: Intervenciones clasificadas por valor P con cocientes de riesgo para la supervivencia libre de progresión e intervalo de confianza del 95% para la tasa de respuesta global de cada tratamiento. IC: intervalo de confianza; HR: hazard ratio; FLOFOX4: Oxaliplatino/Ácido Folínico/5-Fluorouracilo; PFS: Progression-free survival.³² 11

Figura 11: Representación del tratamiento estándar de los pacientes con CHC en estadio avanzado. En primera línea, se administran TKi, principalmente Sorafenib o Lenvatinib o la combinación recientemente aprobada de Bevacizumab + Atezolizumab. En segunda línea los pacientes refractarios a los TKi se tratan con otros o se utilizan inhibidores del punto de control inmunitario anti-PD1 como Nivolumab o Pembrolizumab.³⁶ 12

Figura 12: Modelo del efecto de la actividad reducida de la PNPasa. La pérdida de PNPasa (P) conduce a una menor actividad del complejo de la cadena respiratoria, una disminución del potencial de acción ($\Delta\psi$) y una producción insuficiente de energía en forma de ATP con la consecuente disminución en proliferación.⁴³ 14

Figura 13: Resumen gráfico sobre la función de PNPasa: Translocasa esencial en el procesamiento, la traducción e importación de información genética (ARN mitocondrial) entre el citosol y la matriz mitocondrial.⁴⁵ 14

Figura 14: Localización de PNPT1. Este gen se localiza en el cromosoma 2 en dirección al extremo del brazo corto (p). Imagen obtenida de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) buscando la siguiente identidad: Gene ID: 87178, updated on 23-Nov-2023. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/87178>) 15

Figura 15: Captura de pantalla de la página oficial “The Human Protein Atlas”. Se muestra cómo marcador desfavorable en el pronóstico del cáncer de hígado, páncreas y endometrio, así como estar aumentada su expresión de RNA y proteínas en distintos tipos de cánceres.

FUENTE:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138035-PNPT1/pathology> 16

Figura 16: Formación del complejo NF-Y. NF-Y consta de tres subunidades diferentes: NF-YA, NF-YB y NF-YC, todas imprescindibles para la formación de complejos NF-Y y para la unión a la caja CCAAT activando así la transcripción. Adaptación de la figura 1 de Ly et al., 2013 mediante la plataforma <https://www.biorender.com/>.⁶⁶ 18

Figura 17: Aumento de expresión de las tres subunidades de NF-Y en CHC.	
Diagramas de caja de los niveles de expresión de las tres subunidades NF-Y a nivel génico medidos en MTP (Transcript per Millons). ⁶⁷	18
Figura 18: Estructura del factor de transcripción Sp1. Destacamos el dominio de unión al ADN con los dedos de zinc Cys2His2 (violeta) y el dominio de transactivación (azul claro), compuesto por regiones ricas en serina/treonina flanqueadas por glutamina, localizados cerca del N-Terminal. El dominio de multimerización (beige) facilita la interacción entre múltiples moléculas Sp1 y promueve la superactivación de genes. ⁷⁰	19
Figura 19: Mecanismos de regulación negativa del factor de transcripción Sp mediada por diversos fármacos. ⁷⁴	20
Figura 20: Efecto hepatoprotectores de la Suramina. A). CHC de ratas tratadas con Suramina que muestran una disminución significativa de la actividad de heparanasa en comparación con el grupo control (p<0.05). B). Imágenes representativas de secciones de hígado que muestran una considerable diferencia en cuanto al infiltrado celular en el tracto portal, fibrosis y rotura del tejido hepático que con el tratamiento de Suramina se ve atenuado. ⁷⁸	21
Figura 21: Clasificación funcional de los genes diana del NF-Y. Los genes diana del NF-Y cuya función es conocida o inferida se clasificaron según la función de la proteína codificada. ⁸³	23
Figura 22: Mapa del Vector pUC57-T. Se indican los posibles sitios de unión para la ligación de aquellos insertos de interés que hayan sido cortados con dichas enzimas de restricción.	27
Figura 23: Flujo de trabajo del proceso. Se llevó a cabo una digestión con las enzimas de restricción KpnI y HindIII para aislar las mutaciones objeto de estudio y poder purificarlas posteriormente mediante un protocolo de Promega con el fin de confirmar su correcta construcción y presencia. Fuente: Biorender.	27
Figura 24: Esquema del proceso de transformación bacteriana. Los constructos purificados insertados en el vector pGL4-Luc se introducen en las bacterias termocompetentes denominadas DH5 α . Fuente: Biorender.....	29
Figura 27: Búsqueda del fármaco Suramina en la base de datos Durgbank. Incluye información acerca del nombre genérico del fármaco, una breve explicación del uso habitual, la estructura tridimensional, así como su peso y fórmula química. https://go.drugbank.com/drugs/DB04786	35

- Figura 28: Resultados del Docking empleando Suramina como ligando.** En rojo se encuentra el valor en “score” más alto y en amarillo el segundo más alto. El factor de transcripción está representado en color gris. 35
- Figura 29: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en paciente CHC.** Se clasifican los individuos por etiología vírica o no y según la expresión alta o baja de los niveles de expresión de ARNm de las muestras de tejidos cancerosos analizados. Los datos fueron obtenidos del Human Protein Atlas disponibles en <https://v21.proteinatlas.org> y realizando una búsqueda por genes de interés. 36
- Figura 30: Motivos putativos del promotor humano de PNPT1.** Los sitios de unión ISRE, GC-box y NFY están resaltados con recuadros sólidos, y el sitio de unión putativo SP1 con un recuadro punteado. La secuencia NSRE está subrayada y la ATG inicial (Inr) aparece en negrita. Se muestran los sitios de inicio de la transcripción (TSS) señalados anteriormente. 37
- Figura 31: Análisis mutacional de los motivos predichos del promotor humano de PNPT1.** Las células Hela fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido reportero de luciferasa que contiene 396bp del promotor PNPT1 y plásmidos derivados que contienen segmentos deletéreos de los motivos indicados. Las actividades se midieron 48h post-transfección y se expresaron como valores relativos de la actividad máxima. Se consideró la actividad del constructo promotor de tipo salvaje “WT” (396bp-PNPT1-promluc) como el 100% y la actividad del vector vacío (sin promotor) como el 0%. Análisis estadístico: ANOVA / Tuckey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 6$ (3 ensayos por duplicado) 38
- Figura 32: Efectos de la silenciación de SP1 y NFYA sobre la actividad promotora de PNPT1 en células Hela.** Las células HeLa se transfectaron junto con el plásmido PNPT1 prom-luc de 396 pb y los silenciadores indicados. La actividad de luciferasa se midió en lisados celulares de Hela y se expresó como unidades relativas (%) respecto a las células control. Análisis estadístico: ANOVA / Tuckey: *** $p < 0,001$; $n = 8$ (2 ensayos por cuadruplicado). 39
- Figura 33: Gráficas representativa de los niveles de Resazurina obtenidos en el ensayo sobre los tres grupos celulares testados: dos controles y uno con NFYA silenciado.** A: Medición a un tiempo concreto de 2 horas. B: Ensayo valorado a lo largo de varios tiempos: 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. 39
- Figura 34: Representación gráfica de los datos obtenidos en el ensayo dosis-respuesta.** Se evalúa la actividad mitocondrial según los niveles de fluorescencia

obtenidos por un ensayo con Resazurina en las células tratadas con las concentraciones 0 μ M y 100 μ M de Suramina (A) Micafungina (B) respectivamente. 40

Figura 35: Niveles de proteínas analizados mediante Western blot. Análisis de los lisados de HepG2 tras el tratamiento con Suramina y Micafungina a la dosis determinada como mínima eficaz según ensayos de dosis-respuesta previos (0 μ M y 100 μ M). 41

Figura 36: Estudio IHQ de las proteínas PNPasa, NF-YA y SP1 en muestras de pacientes con cáncer hepatocelular. Se diferencian los niveles de dichas proteínas tomando muestras tanto del centro tumoral como del margen o zonas periféricas. 41

Figura 37: Superposición del sitio de unión de la Suramina a NF-Y con el factor de transcripción. En rojo se sobresalta el sito de unión en el fármaco al que se une el factor de transcripción representado en color verde. Fuente: PyMOL. 42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Volúmenes de BSA y agua empleados para construir de la curva patrón.....	32
Tabla 2: Cantidades de reactivos utilizados para preparar 2 geles de acrilamida (1mm)	32
Tabla 3: Descripción de los anticuerpos utilizados. Compañía comercial, clon, tipo de anticuerpo y dilución de los anticuerpos frente a PNPasa, NF-YA y SP-1.....	34
Tabla 4: Secuencia nativa (WT) y mutantes en los nucleótidos -96 a -1 de la región promotora de PNPT1. Los nucleótidos mutados se muestran en rojo.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Listado de las secuencias mutacionales introducidas en el promotor del gen PNPT1.....	59
Anexo 2: Protocolo del Vector pUC57-T.....	63
Anexo 3: Dictamen del comité de ética de la investigación con medicamentos del hospital La Fe.....	68

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

3D: Tres dimensiones

AFP: Alfafetoproteína

ATP: adenosintrifosfato

BCLC: Clasificación Barcelona Clinic Liver Cancer

CHC: Carcinoma hepatocelular /Cáncer hepatocelular

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

DN: Nódulos displásicos

ECOG: Clasificación Eastern cooperative oncology group

ETC: Cadena de transporte de electrones

FLOFOX4: Oxaliplatino/Ácido Folínico/5-Fluorouracilo

FPKMs: Número de fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas

FT: Factores de Transcripción

HR: Hazard ratio

HS: Heparán sulfato

IC: Intervalo de confianza

IHQ: Inmunohistoquímica

LG/HG: Low grade/High Grade (Bajo/alto grado)

mtDNA: ADN mitocondrial

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica

NF-T (Factor Nuclear Y)

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

O/N: Overnight (toda la noche)

OXPPOS: Fosforilación oxidativa

PFS Supervivencia libre de progresión

TACE: Quimioembolización arteria hepática

TKi: Inhibidores de la Tirosin quinasa

VHC/B: Virus de la hepatitis B/C

WT: Wild-type (nativo)

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	15
1.1.	Hepatocarcinoma	15
1.1.1.	Epidemiología y etiología.....	15
1.1.2.	Factores de riesgo y patogénesis	2
1.1.3.	Clases y características moleculares	5
1.1.4.	Lesiones preneoplásicas: definición histológica.....	6
1.1.5.	Diagnóstico y tratamiento.....	7
1.2.	Función mitocondrial y su relación con la translocasa PNPasa.	13
1.3.	Promotor PNPT1: NFYA Y SP1	15
1.3.1.	La proteína PNPasa	17
1.3.2.	Factores de transcripción NFY y SP1.....	17
1.4.	Relación NFY con Suramina	21
1.5.	Modelos celulares experimentales: HeLa y HepG2	22
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1.	BIOINFORMÁTICA.....	25
3.1.1.	Docking: Suramina y Micafungina (“GOLD”)	25
3.1.2.	Curvas de Kaplan-Meyer	26
3.1.3.	Mutagénesis dirigida.....	26
3.2.	EXPERIMENTAL.....	26
3.2.1.	Clonado y subclonado de las construcciones de ADN	26
3.2.2.	Preparación de placas de agarosa y medio LB	28
3.2.3.	Transformación Construcciones con DH5 α	28
3.2.4.	Transfección de los mutantes del promotor y ensayo de Luciferasa	29
3.2.5.	Transfección de sondas de siARN.....	29
3.2.6.	Cultivos celulares	30
3.2.6.1.	Preparación del medio completo	30
3.2.6.2.	Mantenimiento celular	30
3.2.6.3.	Siembra de HepG2 en placas 6-wells.	30
3.2.6.4.	Lisado celular y cuantificación de proteínas	31
3.2.7.	Western blot.....	32
3.2.8.	Análisis de la actividad mitocondrial con Resazurina.....	33
3.2.9.	Inmunohistoquímica	34
4.	RESULTADOS	35

4.1.	Resultados de Bioinformática.....	35
4.1.1.	Docking (Hermes-GOLD).....	35
4.1.2.	Análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier.....	36
4.1.3.	Análisis del promotor del gen PNPT1 y construcción de mutantes	37
4.2.	Resultados experimentales	38
4.2.1.	Análisis de elementos <i>cis</i> y las construcciones del promotor PNPT1	38
4.2.2.	Ensayo de Luciferasa y Silenciamiento génico	39
4.2.3.	Actividad mitocondrial con Resazurina	39
4.2.4.	Estudio semicuantitativo de niveles de PNPasa mediante Western Blot	40
4.2.5.	Inmunohistoquímica con anticuerpos primarios de PNPasa, NF-YA y SP1 en muestras de pacientes con CHC	41
5.	DISCUSIÓN.....	42
6.	CONCLUSIONES.....	48
7.	BIBLIOGRAFÍA	49
8.	ANEXOS.....	59
8.1.	Anexo 1: Listado de las secuencias mutacionales introducidas en el promotor del gen PNPT1.....	59
8.2.	Anexo 2: Protocolo del Vector pUC57-T.....	63
8.3.	Anexo 3: Dictamen del comité de ética de la investigación con medicamentos del Hospital La Fe.....	67
	68

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hepatocarcinoma

El hígado es un órgano crítico con infinidad de procesos fisiológicos y metabólicos imprescindibles para la vida. Algunas están relacionadas con el metabolismo, almacenamiento y liberación de la glucosa, la digestión de grasas, la eliminación de desechos, la vigilancia inmunológica¹ y la alteración del volumen sanguíneo, así como la destrucción de glóbulos rojos y regulación de la coagulación entre otras.¹

Dichas funciones son llevadas a cabo gracias a los colangiocitos, las células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESL), células estrelladas hepáticas (CSH) y las células inmunitarias residentes en el hígado.²

A pesar de los avances en el conocimiento del desarrollo, metabolismo y reparación hepáticos, las patologías hepáticas, así como el desarrollo de una insuficiencia hepática de diverso origen, siguen representando una importante carga de morbilidad y mortalidad a nivel mundial en la actualidad.³

1.1.1. Epidemiología y etiología

El Carcinoma hepatocelular (CHC) o Hepatocarcinoma es la neoplasia primaria de hígado más frecuente, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo y una de las causas de muerte más común en los pacientes afectados de cirrosis hepática. Las tasas de supervivencia general del CHC avanzado es escasa y no mejora a pesar de las terapias desarrolladas hasta la fecha.⁴ Al mismo tiempo, en los últimos años se ha exaltado la relevancia clínica de esta neoplasia y han aparecido novedades importantes en el diagnóstico, evaluación pronóstica y, especialmente, en el tratamiento del CHC.⁵

El pronóstico es especialmente bajo con una ratio de supervivencia del 12,7% a los 3 años y una supervivencia media de 9 meses.⁶ Tanto la incidencia como la mortalidad han aumentado en América del Norte y diversas regiones europeas (España 8-15 casos/100.000 habitantes), mientras que ha disminuido en regiones que siempre han tenido un alto riesgo, incluyendo Japón y algunas partes del sudeste asiático (>40 casos/100.000 habitantes).⁷

A Incidence

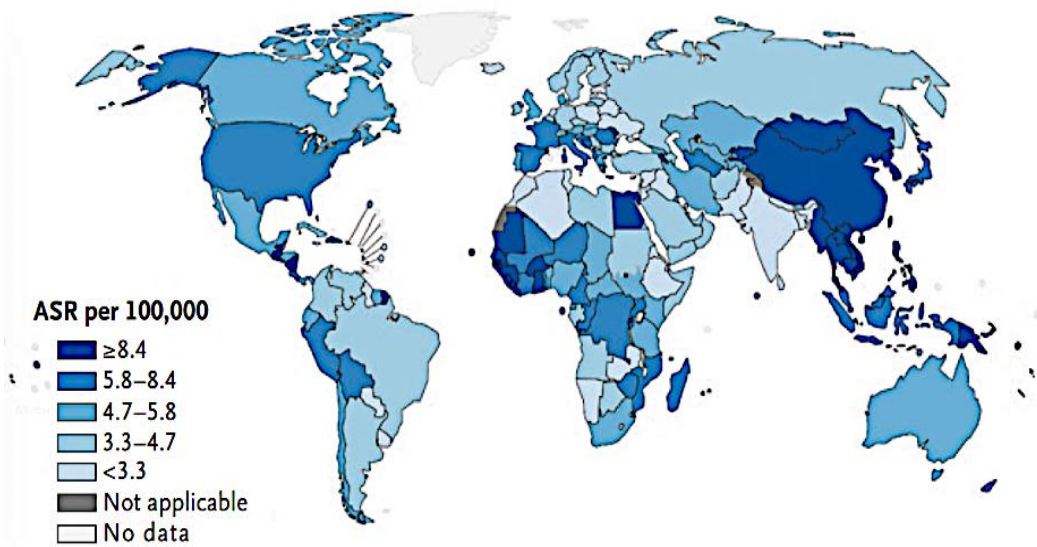


Figura 1: Incidencia de hepatocarcinoma. Distribución según el área geográfica y etiología prevalente.⁸

1.1.2. Factores de riesgo y patogénesis

Respecto a los factores de riesgo, esta enfermedad es inusual en pacientes que carecen de una enfermedad hepática y es cuatro veces más común en hombre que en mujeres. La etiología que predomina en 90% de los casos son los virus hepáticos VHB y VHC, así como el consumo abusivo de alcohol y el tabaquismo, mientras que otras toxinas ambientales afectan en una menor proporción.⁸

El consumo excesivo de alcohol puede provocar un hígado graso, hepatitis aguda o crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). Hay diversos mecanismos a través de los cuales alcohol puede inducir hepatocarcinogénesis, como la producción de especies reactivas del oxígeno debido al exceso de depósito de hierro, la toxicidad del acetaldehído sintetizado, los cambios en la peroxidación lipídica, el deterioro de la respuesta inmunitaria o las modificaciones en la metilación del ADN.⁹

Desde una perspectiva clínica, es bien sabido que el alcohol interactúa con otros factores, como la edad, el sexo, las hepatitis víricas, la obesidad y la diabetes, que conducen a un mayor riesgo de CHC.¹⁰

Se han identificado y caracterizado los principales factores de riesgo y agentes etiológicos responsables del desarrollo del CHC en humanos. Entre ellos se encuentran la infección por los virus de la Hepatitis B o C, la exposición a la aflatoxina B1, drogas hepatotóxicas o sustancias químicas y la cirrosis de cualquier etiología (alcohólica o secundaria a enfermedades hepáticas genéticas).¹¹

El conjunto de estas condiciones ocasiona una inflamación crónica, dando lugar a la necrosis continua y regeneración tisular. Por lo tanto, las especies reactivas de oxígeno, citocinas inflamatorias y fibrosis provocan una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la aparición de esta enfermedad. Sin embargo, no se tiene conocimiento total de los eventos moleculares precisos que tienen lugar.¹²

En la figura 2 se muestra una visión global de los agentes etiológicos que más contribuyen a la hepatocarcinogénesis. Todos ellos se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular. Sin embargo, la mayoría no son directamente carcinógenos en sí, sino que contribuyen a la aparición de una lesión hepática preneoplásicas (hepatitis crónica y cirrosis) característica del medio en el que a menudo se suele asentar y, con ello, desarrollar el carcinoma hepatocelular.¹¹

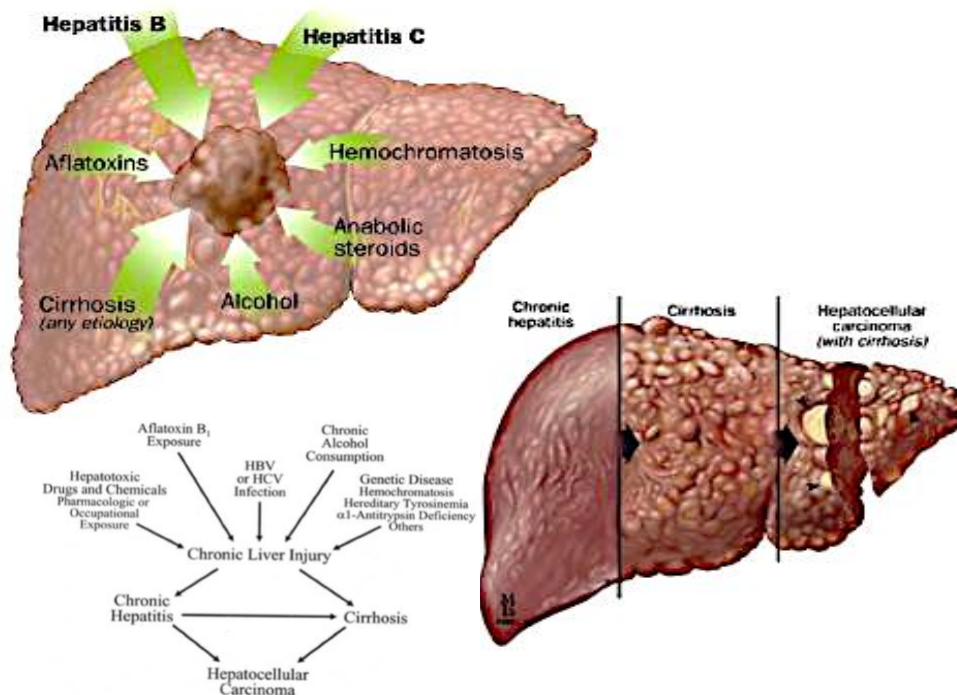


Figura 2: Representación de cómo la incidencia de diversos estresores desencadena la aparición de una hepatitis crónica. Se trata del estadio inicial, el cual evolucionará hasta convertirse en un Carcinoma hepatocelular pasando por el estadio de Cirrosis hepática (estado de cicatrización post-lesión crónica y con función anormal del órgano)¹¹

La obesidad ha sido reconocida como un componente clave del síndrome metabólico y se ha relacionado con una mayor frecuencia de cánceres de varios tejidos, incluido el hígado. Las interacciones sinérgicas entre las vías oncogénicas vinculadas a la obesidad y la hepatopatía crónica pueden explicar por qué el CHC es una de las pocas neoplasias malignas cuya incidencia va en aumento en los países desarrollados. Una mejor comprensión de este complejo proceso mejorará nuestras estrategias de prevención, predicción y vigilancia del cáncer.¹³

Estos factores de riesgo favorecen un medio inflamatorio progresivo que da lugar a un ciclo de necrosis y regeneración y al desarrollo de inestabilidad cromosómica. Las alteraciones genéticas y epigenéticas junto con el acúmulo de especies reactivas del oxígeno, citoquinas inflamatorias y fibrosis van a conducir al inicio del CHC. Los eventos moleculares exactos que subyacen la formación del CHC todavía siguen sin comprenderse por completo.¹⁴

Estudios recientes han explorado las alteraciones genómicas del CHC y han identificado genes mutados con frecuencia, como son el promotor TERT, TP53 y CTNNB1 (β -catenina).¹⁵

Otro estudio que incluye diversos análisis mutacionales tanto del número de copias, perfiles de metilación, así como estudios de RNA, exomas y proteómica han permitido obtener una gran cantidad de información y asociaciones con respecto al carcinoma hepatocelular. Los ensayos integrativos de estas múltiples plataformas genómicas revelaron ciertos genes mutados durante el proceso oncogénico que alteran el equilibrio de los hepatocitos. Estos análisis de mutaciones y vías permiten subclassificar las influencias genéticas del CHC, así como a los pacientes según perfiles de expresión y proporcionan posibles direcciones para futuros esfuerzos terapéuticos.¹⁶

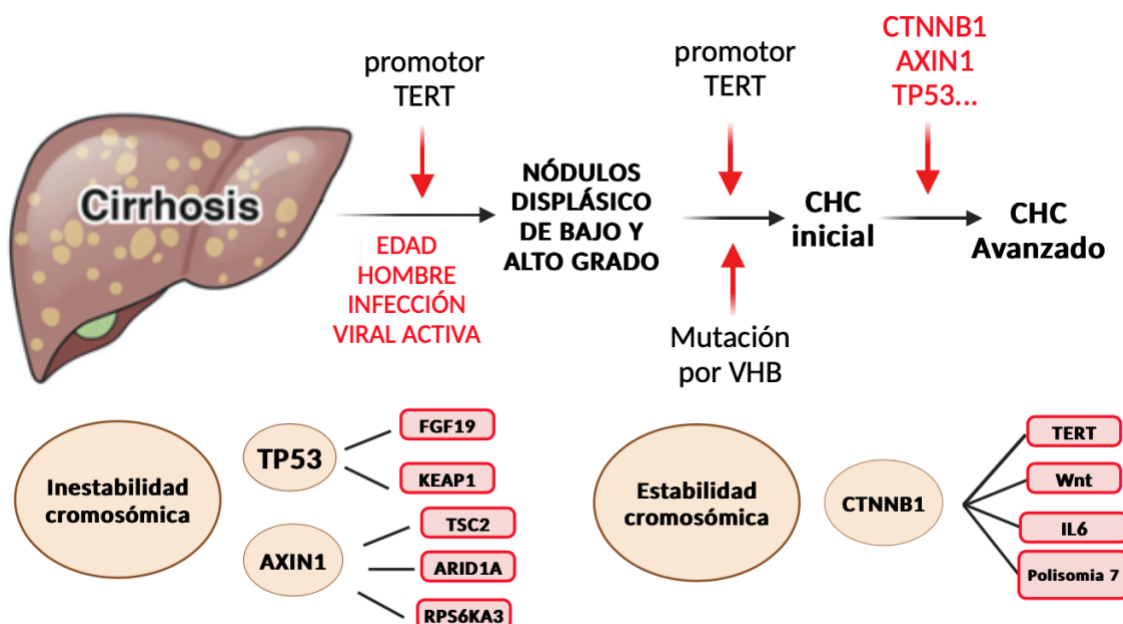


Figura 3: Ilustración adaptada de la revisión bibliográfica realizada sobre el tema. Esquemáticamente se muestran los factores de riesgo, las vías de señalización y los genes mutados durante el proceso de inflamación y fibrosis que culminan con la aparición de un hepatocarcinoma avanzado. Fuente: Biorender.

1.1.4. Lesiones preneoplásicas: definición histológica

Las lesiones preneoplásicas del carcinoma hepatocelular son los nódulos displásicos de bajo grado y los nódulos displásicos de alto grado desarrollados en la cirrosis, así como los adenomas hepatocelulares que se producen principalmente en el hígado normal; así pues, la cirrosis precede al CHC en el 80-90% de los pacientes.¹⁹

Microscópicamente, existe una proliferación monoclonal y descontrolada de hepatocitos bien diferenciados que se caracteriza por la ausencia de tríada porcal y conducto biliar. El proceso pasa por varios estadios según se van adicionando las principales alteraciones patológicas, inmunohistoquímica y moleculares desde la aparición de una lesión preneoplásica hasta el desarrollo de CHC precoz.¹⁹

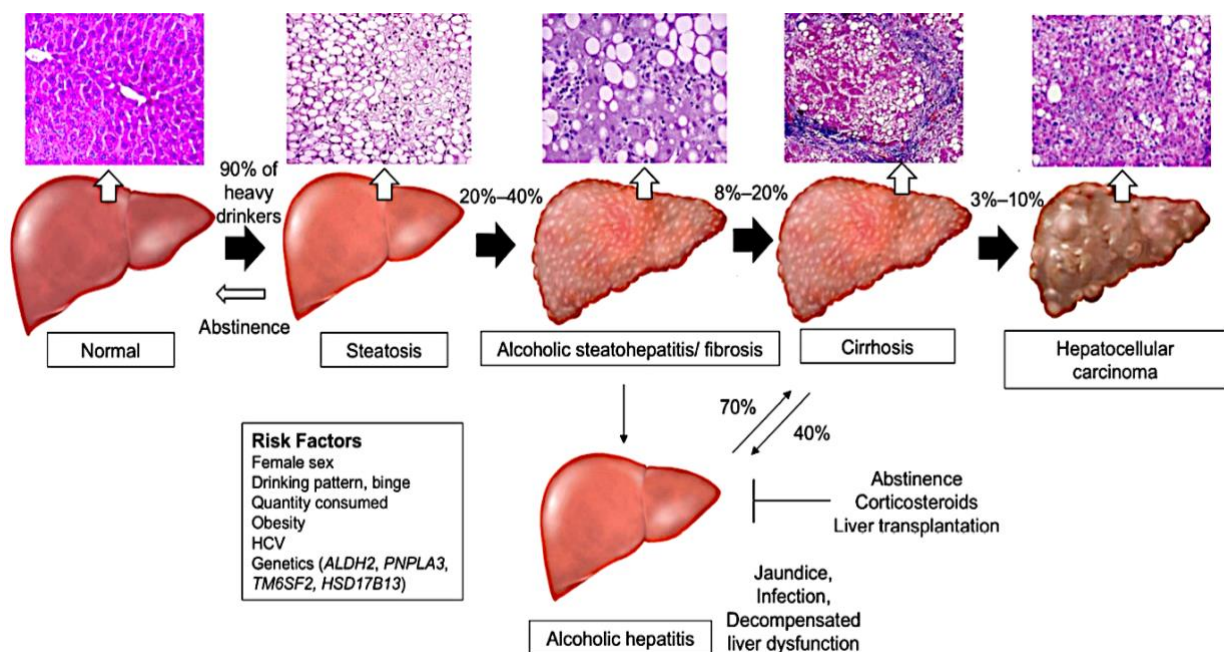


Figura 5: Proceso de evolución desde un hígado normal hasta la aparición del CHC pasando por distintas lesiones preneoplásicas. Representación que ilustra las etapas del desarrollo del hepatocarcinoma y muestra cortes histológicos de pacientes en cada estadio, visualizados al microscopio mediante tinción de hematoxilina.¹⁸

Los hígados cirróticos presentan áreas focales de hepatocitos anormales e inmaduros que corresponden a focos displásicos si miden <1 mm o nódulos displásicos (DN) (≥ 1 mm). Los DN se clasifican en bajo y alto grado en función de la presencia de atipia celular, invasión o patrones trabeculares. Al mismo tiempo, también se subclasifica en temprano o progresado en función de la presencia de invasión estromal como rasgo distintivo entre otras características mostradas en la Figura 6.

El CHC precoz se refiere a nódulos tumorales pequeños (<2 cm) bien diferenciados (grado 1) con márgenes indistintos, y actualmente se acepta como una entidad independiente con un buen pronóstico. Cuando el tamaño es superior a 2 cm, aparecen grados de diferenciación mayores (G2/G3) o encontramos ciertos grados de invasión y metástasis, ya hablaríamos de CHC progresado.²⁰

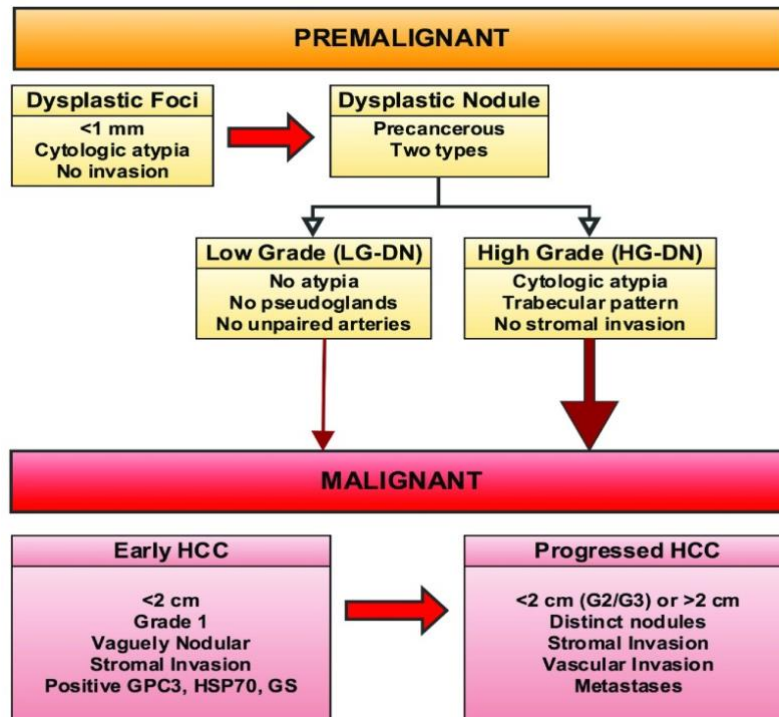


Figura 6: Historia natural tanto de las lesiones precancerosas como del CHC incluyendo las características propias que las diferencian y permiten la subclasificación en foco displásico, nódulo displásico, CHC precoz o progresado.²⁰

1.1.5. Diagnóstico y tratamiento

A grandes rasgos, las manifestaciones clínicas del carcinoma hepatocelular (CHC) suelen incluir dolor abdominal, síndrome tóxico, pérdida de peso, anorexia, náuseas, así como la presencia, en la mayoría de los casos, de una masa abdominal, ascitis, fiebre e incluso hemorragia digestiva. Además, en caso de crisis obstructiva la principal manifestación es la ictericia.²¹ La cirrosis representa el mayor factor de riesgo de esta neoplasia maligna y es la principal indicación de cribado y vigilancia.²²

Dentro de los diversos algoritmos desarrollados para la detección del CHC, los métodos principales para el diagnóstico se basan en estudios de imagen y las pruebas de laboratorio. Las técnicas de imagen empleadas incluyen la ecografía, tomografía computarizada, gammagrafía y resonancia magnética.²³

En cuanto a las pruebas de laboratorio, el biomarcador sérico más ampliamente utilizado para la vigilancia y decisión del tratamiento del CHC es la alfafetoproteína (AFP).²⁵ Se describió por primera vez como biomarcador útil para el CHC hace más de cincuenta años, en modelos murinos y, posteriormente, en estudios poblacionales africanos y siberianos.

El papel de la AFP como herramienta de cribado y la selección de su punto de corte más preciso dependen de la prevalencia de CHC en la población analizada. Además, el estudio realizado por Chen et al. demostró que acelera la progresión tumoral en células de ratón así como comprobó que promueve la proliferación *in vitro* y tumorigénesis *in vivo* en células de CHC, siendo así considerada como el biomarcador principal para el análisis del diagnóstico y pronóstico de dicho cáncer.²⁴

Sin embargo, la AFP sérica puede estar elevada en otras enfermedades benignas o malignas como la hepatitis aguda o crónica, colangiocarcinoma intrahepático y tumores embriogénicos, por lo que su especificidad se ha puesto en duda. Por este motivo, resulta de vital importancia explorar la identificación de nuevos biomarcadores con fines pronósticos o predictivos, dado que podrían tener un impacto significativo en la práctica clínica.²⁷

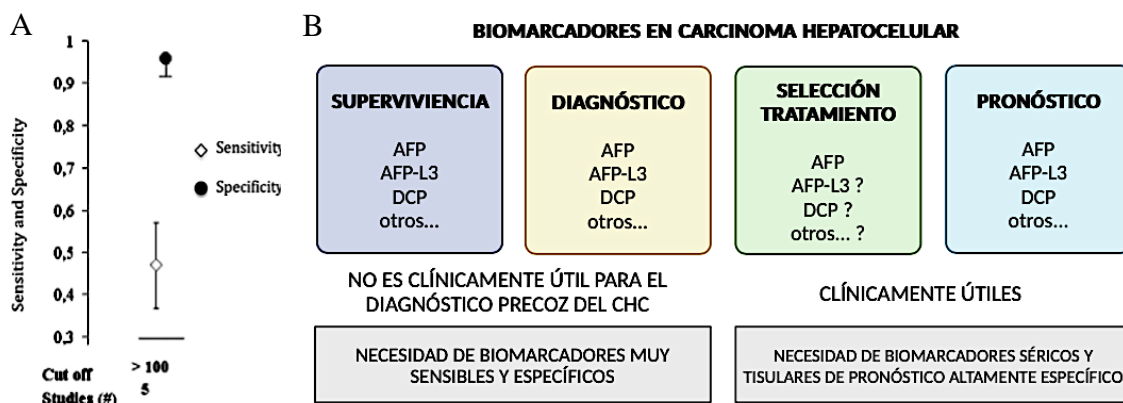


Figura 7: Representación gráfica de los diversos biomarcadores utilizados en la actualidad en CHC. Debido a su moderada sensibilidad, pero alta especificidad (A), la AFP es la principal herramienta utilizada tanto para diagnosticar, seleccionar el mejor tipo de tratamiento, así como para determinar la supervivencia y pronóstico (B).²⁵⁻²⁷ Adaptación de revisión bibliográfica. Fuente: Biorender.

Además del tamaño tumoral, la función hepática, las pruebas de imagen y los marcadores séricos, otros parámetros adicionales como la biopsia tumoral y la subclasificación de los sistemas de estadificación actuales, se tienen en cuenta para determinar el tipo de patrón de progresión tumoral y mejorar la selección de pacientes para el tratamiento.²³ Al igual que ocurre con otras enfermedades hepáticas y tumorales, la biopsia hepática constituye un componente crítico para establecer un diagnóstico certero.²⁸

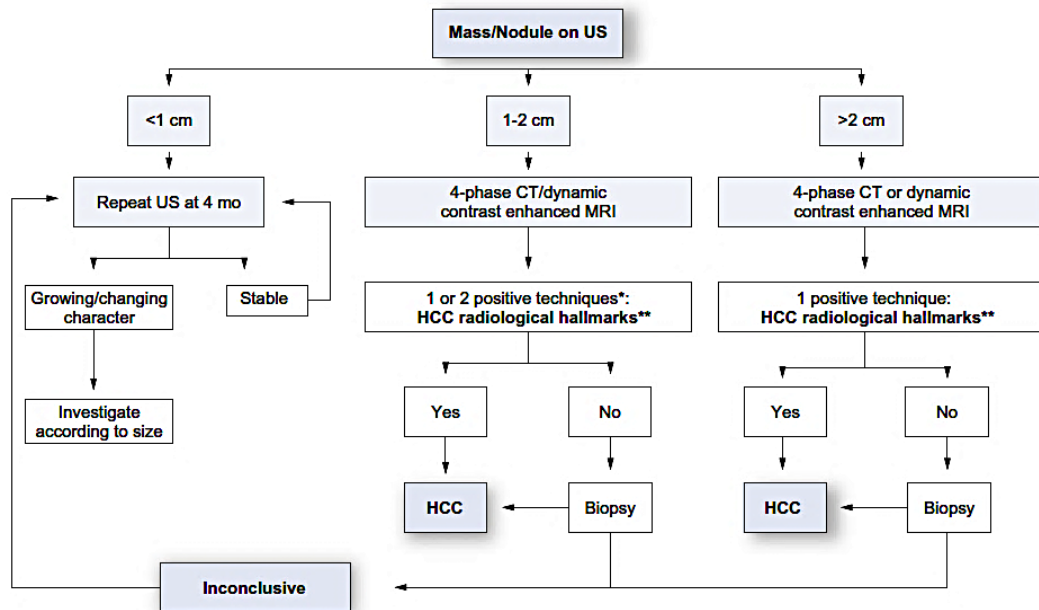


Figura 8: Algoritmo diagnóstico. *Una técnica de imagen solo recomendada en centros con equipos de radiología de alta calidad. ** Características radiológicas del HCC: hipervascularidad arterial y lavado venoso / fase tardía.²⁸

A pesar de los esfuerzos de cribado y los avances en los tratamientos médicos, locorregionales y quirúrgicos, el carcinoma hepatocelular sigue siendo una de las causas más frecuentes de muerte por cáncer en todo el mundo. En parte se debe al hecho de que la mayoría de los pacientes presentan enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico añadiendo un alto riesgo de recurrencia tras la cirugía curativa.²⁹

Tiene sentido, por tanto, que el objetivo principal en estos pacientes sea el diagnóstico precoz y la constante vigilancia del CHC cuando aún es posible curarlo.

Los avances en el tratamiento del CHC han incluido la identificación de los pacientes con más probabilidades de obtener un beneficio clínicamente significativo de las opciones terapéuticas disponibles. Además, se están investigando las estrategias de combinación de terapias locorregionales y/o sistémicas.²³

Entre las distintas terapias existentes, en primer lugar, destaca la opción quirúrgica en aquellos tumores solitarios en estadio temprano si el paciente no tiene ninguna alteración cardíaca y presenta un buen estado funcional. En segundo lugar, las opciones transarteriales se contemplan en pacientes que posean tumores en estadio intermedio (BCLC Estadio B) y, por último, las opciones sistémicas recomendadas para aquellos pacientes con enfermedad avanzada (BCLC Estadio C).⁸ También se están desarrollando, combinaciones de terapias sistémicas y locorregionales para tratar el CHC intermedio o localmente-avanzado.³¹

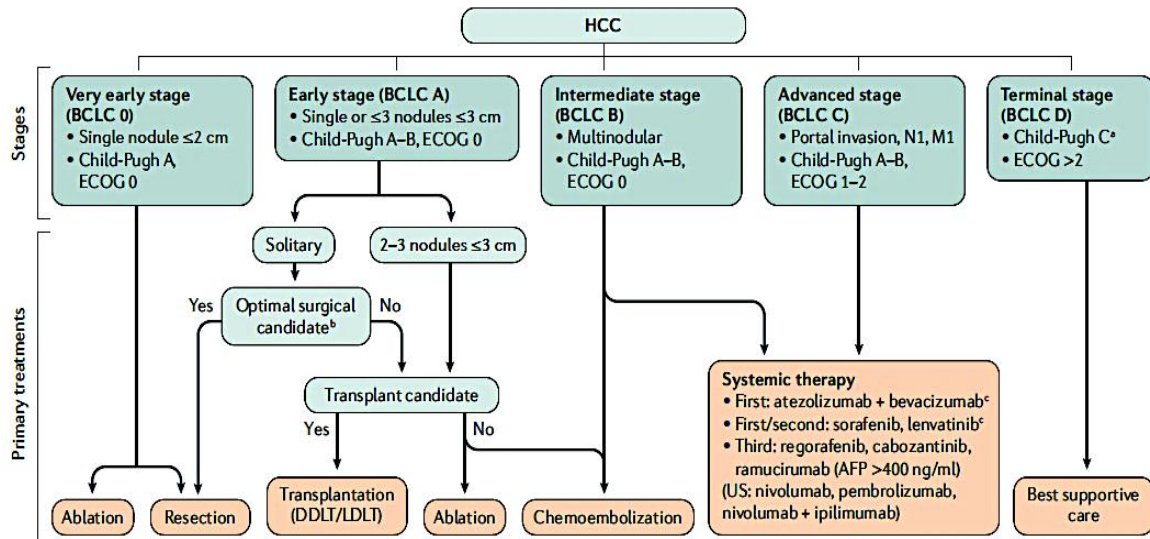


Figura 9: Algoritmo de tratamientos primarios según el estadio del CHC. Fuente: Llovet et al. 2021.

La quimioterapia convencional no ha alterado la historia natural del CHC avanzado y metastásico por lo que se han buscado alternativas de tratamientos a nivel sistémico. Entre las terapias sistémicas aprobadas, se encuentran los inhibidores de multincinasas, de “check-points” inmunitarios y terapias farmacológicas combinadas.³⁰ El Sorafenib (inhibidor de la Tirocin quinasa) que reduce la capacidad de división y crecimiento celular fue el primer agente aprobado por la FDA en 2016 para tratar el CHC avanzado.⁴

Desde el advenimiento del Sorafenib como opción de tratamiento activo para los pacientes que con enfermedad avanzada o metástasis, se han aprobado seis terapias sistémicas basadas en ensayos de fase III (Atezolizumab más Bevacizumab, Sorafenib, Lenvatinib, Regorafenib, Cabozantinib y Ramucirumab [AFP > 400 ng/mL]) y otras tres terapias han obtenido la aprobación acelerada de la FDA debido a la evidencia de su eficacia³¹

Atezolizumab más Bevacizumab es el primer régimen combinado de inmunoterapia y tratamiento vascular que se recomienda como opción de primera línea en CHC irresecables tal como se resumen en la revisión llevada a cabo por Leowattana W et al, 2023.³²

Además, un grupo de investigación de China realizó un metaanálisis para valorar la secuencia de tratamiento óptima para el CHC e informar acerca de las tasas de supervivencia obtenidas con los distintos tratamientos mostrados en la Figura 10.³³

Atezolizumab más Bevacizumab ocupó el primer puesto en supervivencia libre de progresión y global, aunque también obtuvo las tasas más altas de discontinuaciones por acontecimientos adversos. Sus beneficios eran superiores frente a Nivolumab, Sorafenib y Lenvatinib.³³ Este último, encabezó el primer lugar en la tasa de respuesta global y fue el segundo en la supervivencia libre sin progresión.

Sin embargo, ninguno de ellos ha mostrado ser superior y suficiente como único tratamiento aislado para tratar el CHC avanzado según el metaanálisis realizado por Yue Han et al, 2021. Por esta razón, el tratamiento sistémico de primera línea debe seleccionarse en función de objetivos terapéuticos individualizados los cuales proporcionan datos comparativos valiosos que podrán ayudar a fundamentar las decisiones terapéuticas.³³

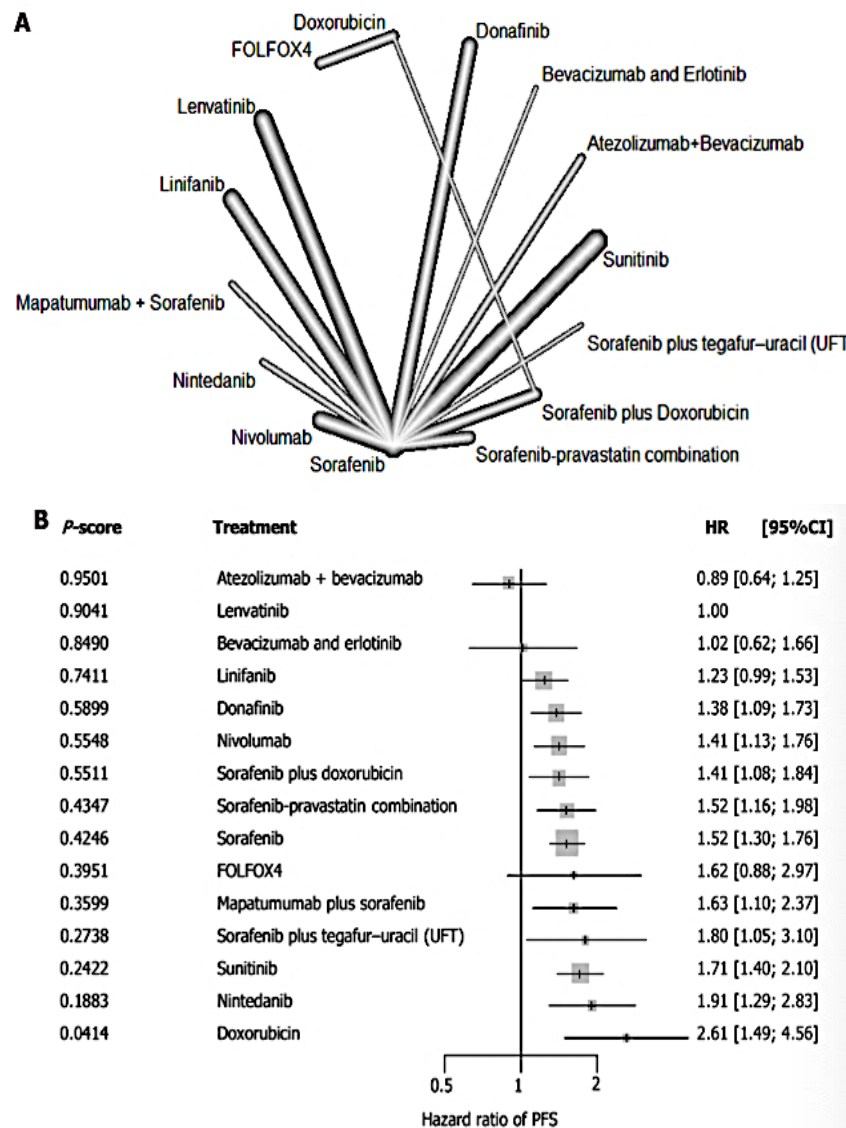


Figura 10: Resultados de supervivencia en pacientes con CHC avanzado tras tratamiento sistémico de primera línea. A: Diagrama de red; B: Intervenciones clasificadas por valor P con cocientes de riesgo para la supervivencia libre de progresión e intervalo de confianza del 95% para la tasa de respuesta global de cada tratamiento. IC: intervalo de confianza; HR: hazard ratio; FLOFOX4: Oxaliplatino/Ácido Fólnico/5-Fluorouracilo; PFS: Progression-free survival.³²

En resumen, en los estadios locales de 0 y A se podría optar por un tratamiento curativo mediante resección tumoral o trasplante hepático combinado o no con RT. Sin embargo, la complejidad de esta enfermedad demuestra que la opción curativa es limitada ya que el 80%-90% aparecen sobre hígados cirróticos y sólo el 12% son elegibles para su resección o trasplante. Además, su evolución a metástasis es bastante frecuente y cuando lo hacen la localización más frecuente son las pleuropulmonares.³⁵

Los métodos seleccionados para los tumores en estadio B incluyen tratamientos locorregionales como la TACE (*Quimioembolización arteria hepática o TARE radioembolización transarterial*) y la ablación por radiofrecuencia entre otros. Hoy por hoy, Lenvatinib puede sustituir a TACE con igual eficacia en los casos en los que no puede utilizarse el tratamiento locorregional.³⁶

Hasta 2016, la única opción de tratamiento sistémico para el estadio C era el Sorafenib. Pero, como hemos comentado anteriormente, Lenvatinib se convirtió en un fármaco de segunda línea al mostrar no inferioridad frente a Sorafenib en supervivencia general. Por último, los estadios D precisarán de tratamiento de soporte y paliativo.³⁶

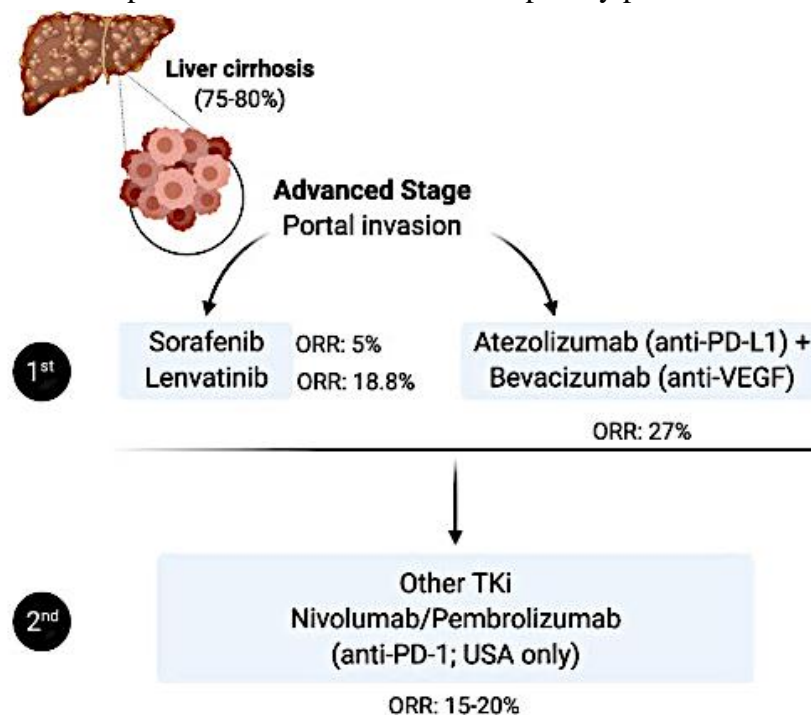


Figura 11: Representación del tratamiento estándar de los pacientes con CHC en estadio avanzado. En primera línea, se administran TKi, (Sorafenib o Lenvatinib) o la combinación recientemente aprobada de Bevacizumab + Atezolizumab. En segunda línea, otros TKi o inhibidores del punto de control inmunitario anti-PDI como Nivolumab o Pembrolizumab.³⁶

A pesar de la existencia de todas estas opciones terapéuticas en la actualidad, la mortalidad del CHC sigue en aumento, por lo que todavía es necesaria mucha investigación con el fin de desarrollar tratamientos y descubrir fármacos de alto impacto clínico.³⁷

El trabajo de nuestro laboratorio busca abrir una nueva vía en este sentido centrándonos en el gen PNPT1 como diana terapéutica, ya que los niveles de este tienen una correlación positiva con el mal pronóstico del CHC de los pacientes.

Buscamos alterar la regulación del gen, incidiendo sobre factores de transcripción que se encuentran en el promotor de este gen, como NF-YA y SP1, los cuales ayudan a la transcripción de la translocasa PNPasa. Su silenciamiento podría aumentar los porcentajes de supervivencia en combinación con otras terapias.

1.2. Función mitocondrial y su relación con la translocasa PNPasa.

Las mitocondrias son orgánulos productores de energía en forma de ATP a través del proceso conocido como fosforilación oxidativa. Al mismo tiempo, se encargan de regular complejas vías de señalización, diferenciación y activación de las células inmunitarias durante la infección, desencadenando la autofagia y apoptosis.³⁸

Están compuestos por dos membranas, externa e interna, separadas que dejan un espacio intermembrana y compartimentos de la matriz que desempeñan distintas funciones. Poseen su propio genoma (mtDNA), el cual se replica de forma independiente al genoma del huésped.³⁹ En los humanos, el mtDNA es el encargado de codificar 13 proteínas relacionadas con la fosforilación oxidativa (OXPHOS). El resto de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear y se importan a las mitocondrias, de ahí lo esencial que resulta que exista una buena comunicación entre los dos genomas y trabajen en conjunto.⁴⁰

De esta manera, es lógico pensar que la disfunción mitocondrial en un tejido pueda desencadenar una gran variedad de enfermedades como el cáncer y, por tanto, este defecto en su función tendrá consecuencias a nivel sistémico en el organismo afecto.⁴¹ Además, se ha demostrado en un estudio que las mutaciones asociadas al cáncer son aquellas que permiten a las células cancerosas adquirir y metabolizar nutrientes de una manera que se favorece la proliferación celular en vez de la producción eficiente de ATP.⁴²

Una causa de la disfunción mitocondrial es el estrés oxidativo, provocando daños celulares tales como alteración de ácidos nucleicos, modificación de lípidos y daño proteico.⁴³ Por tanto, el metabolismo alterado de las células tumorales posibilita que aquellos tratamientos que modifiquen el metabolismo hacia *Oxphos* puedan llegar a ser terapéuticamente efectivos contra el cáncer.⁴¹

Se ha observado cierta relación entre los niveles de respiración mitocondrial y la actividad de la proteína PNPasa. Mediante un modelo se ha descrito que la reducción en la actividad de la PNPasa conduce a una reducción en actividad del complejo de la cadena respiratoria y producción de ATP.⁴⁴

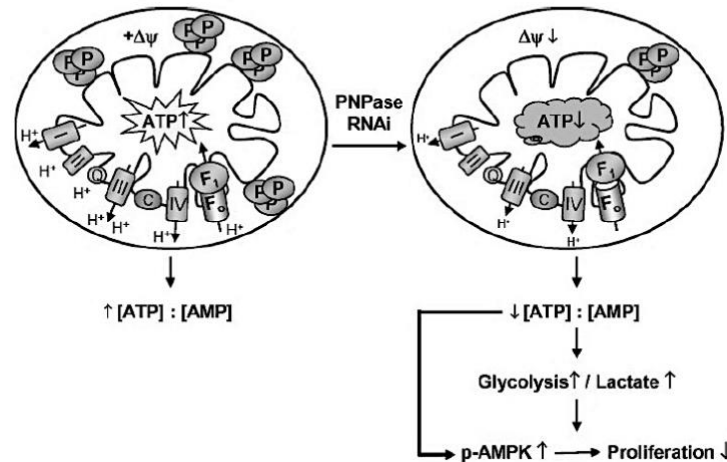


Figura 12: Modelo del efecto de la actividad reducida de la PNPasa. La pérdida de PNPasa (P) conduce a una menor actividad del complejo de la cadena respiratoria, una disminución del potencial de acción ($\Delta\psi$) y una producción insuficiente de energía en forma de ATP con la consecuente disminución en proliferación.⁴³

Además, un reciente estudio demostró el relevante papel que tiene la PNPasa en la regulación de la importación del ARN codificado entre el núcleo y la matriz mitocondrial, (proceso dependiente de la PNPasa). Se sugiere que la PNPasa regula los niveles de nucleótidos de adenina y la homeostasis mitocondrial alterando la translocación de ARNs a las mitocondrias con el fin de controlar la abundancia de la cadena de transporte de electrones (ETC). Así pues, la reducción de PNPasa supone una alteración en dicho proceso acumulándose transcritos policistrónicos precursores y disminuyendo las proteínas ETC.⁴⁵

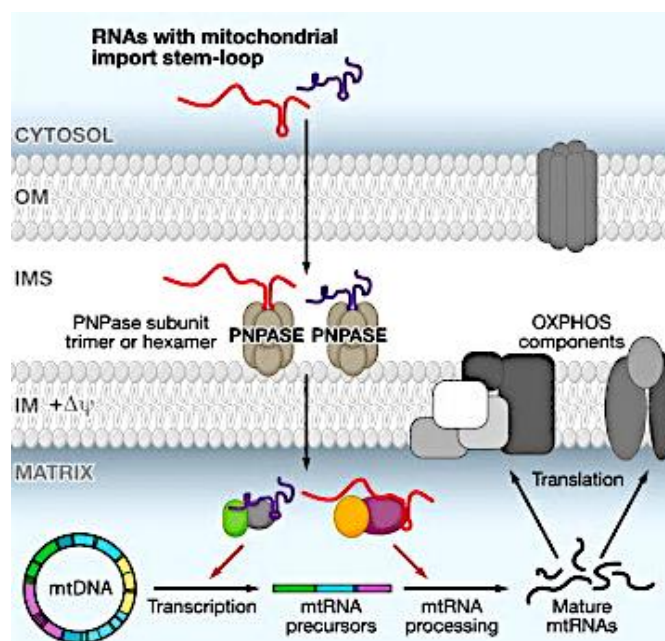


Figura 13: Resumen gráfico sobre la función de PNPasa: Translocasa esencial en el procesamiento, la traducción e importación de información genética (ARN mitocondrial) entre el citosol y la matriz mitocondrial.⁴⁵

1.3. Promotor PNPT1: NFYA Y SP1

El gen PNPT1 (Human polyribonucleotide Nucleotidyltransferase 1) se encuentra localizado en el cromosoma 2 en la región citogenética 2p15-2p16.1 y codifica la enzima PNPasa, un polinucleótido fosforilasa, el cual cumple funciones de alteración postraduccional, transporte e importación de RNA imprescindibles para la supervivencia y mantenimiento de la información genética de la mitocondria.

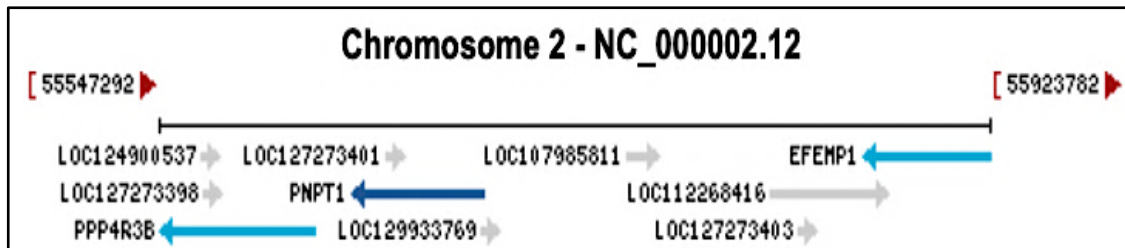


Figura 14: Localización de PNPT1. Este gen se localiza en el cromosoma 2 en dirección al extremo del brazo corto (p). Imagen obtenida de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) buscando la siguiente identidad: Gene ID: 87178, updated on 23-Nov-2023. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/87178>)

Se ha propuesto que alteraciones germinales en esta proteína está relacionada con diferentes tipos de tumores, aunque los mecanismos no son bien conocidos.⁴⁶ Algunos de los cánceres descritos cuya patogenia se asocia con alteraciones en niveles de expresión del gen PNPT1 son: Linfoma difuso de células B grandes⁴⁷, Leucemia linfoblástica aguda⁴⁸, Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)⁴⁹ o Cáncer de vejiga⁵⁰.

Otros estudios recientes también han demostrado que la deficiencia de PNPT1 provoca una acumulación de ARNmt de doble cadena en el citoplasma, liderando la activación aberrante del interferón tipo I, lo que podría estar implicada en numerosos procesos proinflamatorios como la encefalopatía.⁵¹

Además, hay diversos reportes e investigaciones que han confirmado la presencia de mutaciones en PNPT1 como causa de un programa de expresión de genes metabólicos alterados⁵² y diversas patologías tales como síndrome de Leigh⁵³, sordera no sindrómica recesiva⁵⁴, mielinización anormal retardada⁵⁵, aumento del gen c-MYC por interacción con EGFR⁵⁶ e incluso defectos en la coroides y retina ocular⁵⁷.

En resumen, según *The Human Protein Atlas*, PNPT1 es una proteína de unión al ARN implicada en numerosos procesos metabólicos del ARN. Principalmente cataliza la fosforólisis de polirribonucleótidos monocatenarios de forma procesiva en la dirección 3'-a-5' y es un marcador pronóstico desfavorable en cáncer hepático, pancreático y endometrial entre otros (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138035-PNPT1/summary/gene>).

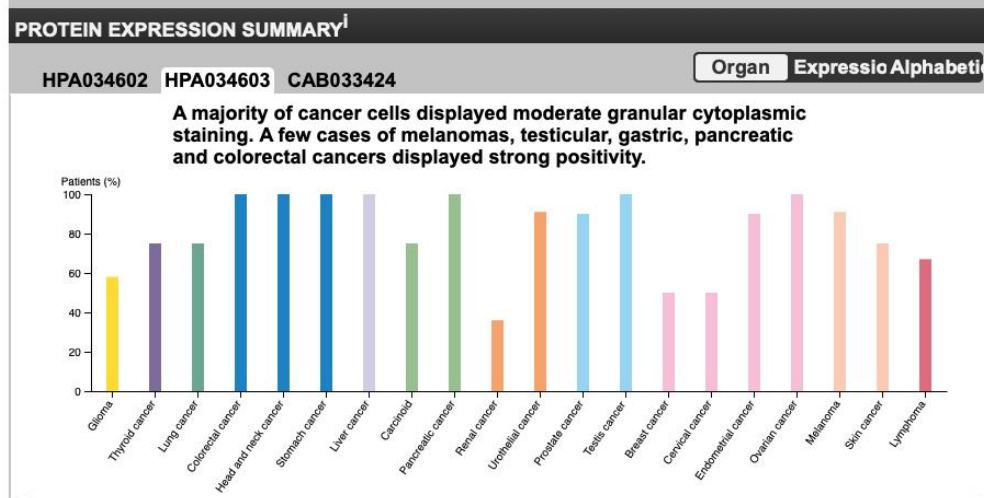
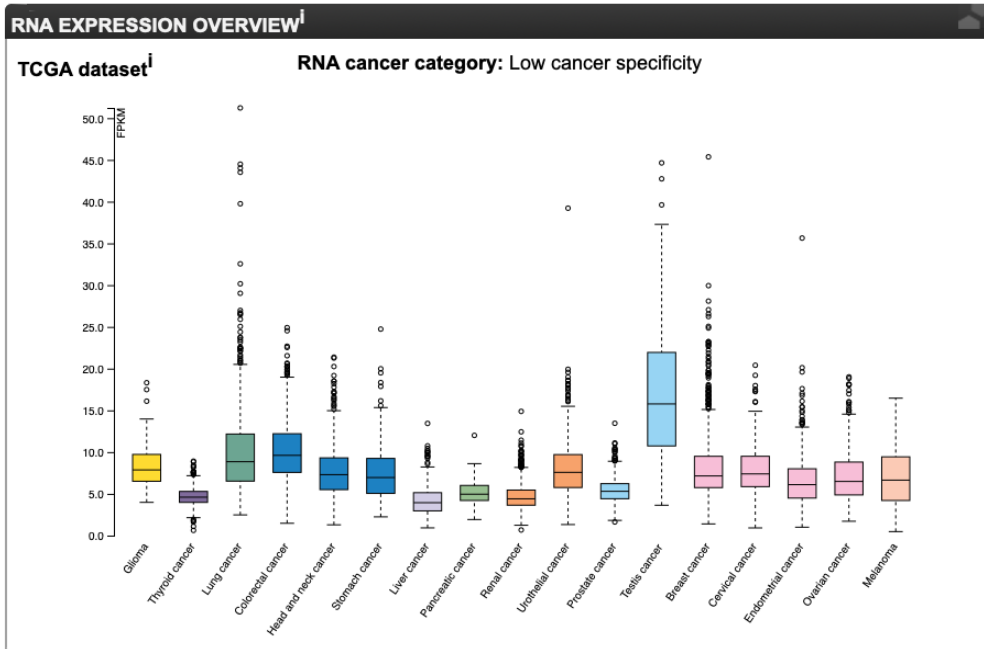
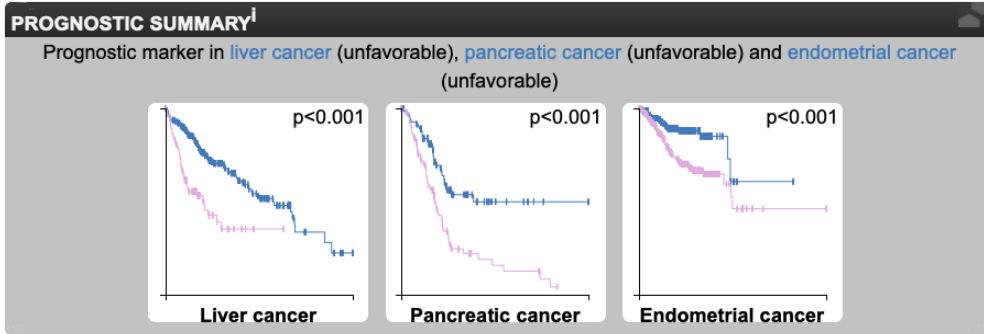


Figura 15: Captura de pantalla de la página oficial “The Human Protein Atlas”. Se muestra cómo marcador desfavorable en el pronóstico del cáncer de hígado, páncreas y endometrio, así como estar aumentada su expresión de RNA y proteínas en distintos tipos de cánceres. FUENTE: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138035-PNPT1/pathology>

Se han descrito cuatro factores de transcripción relacionados con la regulación del gen PNPT1: SP1, NF-Y, ISRE Y NRSE.⁵⁸

1.3.1. La proteína PNPasa

La PNPasa es una ribonucleasa en el espacio intermembrana mitocondrial. Esta curiosa localización se debe principalmente a la presencia de la proteína TCL1, la cual es una oncoproteína, que si se sobreexpresa puede provocar el desacoplamiento de la PNPasa en su localización mitocondrial habitual actuando como un “interruptor mitocondrial”. Como consecuencia, puede provocar tanto la inhibición de la biogénesis mitocondrial como la fosforilación oxidativa deprimiendo la vía glicolítica.⁵⁹

Su importancia radica en su función como reguladores de la importación de ARN codificados en el núcleo a la matriz mitocondrial. Algunos de los RNA relacionados con la PNPasa son el RNAr 5s, RNasa P o RNA RNasa MRP. Los datos apoyan firmemente el papel previsto de PNPasa en la mediación de la translocación de ARN a la mitocondria.⁶⁰

1.3.2. Factores de transcripción NFY y SP1

El factor de transcripción NF-Y (Nuclear Factor Y) es un factor de transcripción trimérico formado por la secuencia específica NF-YA y el dímero NF-YB/NF-YC del dominio de plegamiento de histonas (HFD).⁶¹ Se describió por primera vez como uno de los factores de unión CCAAT, lo cual suscitó mucho interés entre la comunidad científica debido a su papel en la regulación de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) cruciales para la respuesta inmunitaria.⁶²

La vital importancia fisiológica del NF-Y se ha documentado en modelos de ratones NF-YA *knockout*, en embriones y en experimentos condicionales en sistemas hepáticos, hematopoyéticos, neuronales y adipocitos.⁶³

NF-YB y NF-YC contienen motivos de plegamiento de histonas conservados evolutivamente y comunes a todas las histonas centrales, que median la dimerización, una característica estrictamente necesaria para la asociación NF-YA y la unión al ADN de secuencias específicas.⁶⁴

En casi todos los casos descritos hasta ahora, la unión del trímero es importante para la regulación transcripcional. Concretamente es la subunidad NF-YA la que posee mayor capacidad de unión específica, pero no cumple su cometido sin un *splicing* y las modificaciones postraduccionales adecuadas para el ensamblarse del complejo trimérico.⁶⁵

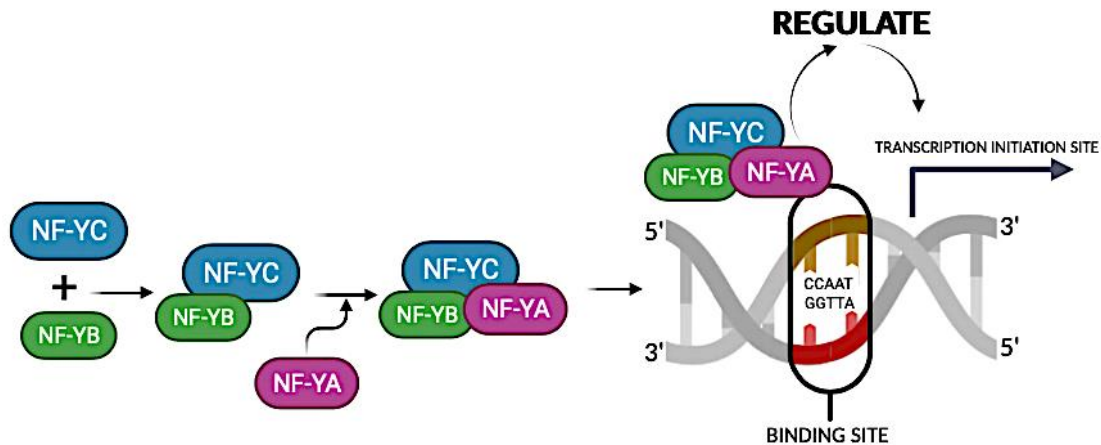


Figura 16: Formación del complejo NF-Y. NF-Y consta de tres subunidades diferentes: NF-YA, NF-YB y NF-YC, todas imprescindibles para la formación de complejos NF-Y y para la unión a la caja CCAAT activando así la transcripción. Adaptación de la figura 1 de Ly et al., 2013 mediante la plataforma <https://www.biorender.com/>.⁶⁶

En general, los datos sobre los niveles de ARNm de las subunidades NF-Y en el cáncer son de reciente aparición. En informes iniciales sobre cohortes individuales de cáncer de ovario, mama y gástrico, se demostró que NF-YA está sobreexpresado. Además, se han completado análisis de Carcinoma de Mama (BRCA), Carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC) y Adenocarcinomas (LUAD) que demuestran que el factor NF-YA se encuentra sobreexpresado, pero no las subunidades HFD.⁶⁶

Investigaciones recientes han indicado que la subunidad NF-YA desempeña un papel en el avance y el crecimiento del carcinoma hepatocelular (CHC). El estudio realizado por Bezzecchi et al. (2020) muestra un aumento significativo de la expresión de NF-YA en muestras de tejido obtenidas de pacientes con CHC (Figura 17). La sobreexpresión observada de NF-YA se asocia con una peor evolución clínica global y mal pronóstico de la enfermedad. Estos hallazgos sugieren que el papel regulador del NF-YA le otorga el potencial de ser una diana terapéutica para el tratamiento del CHC.⁶⁷

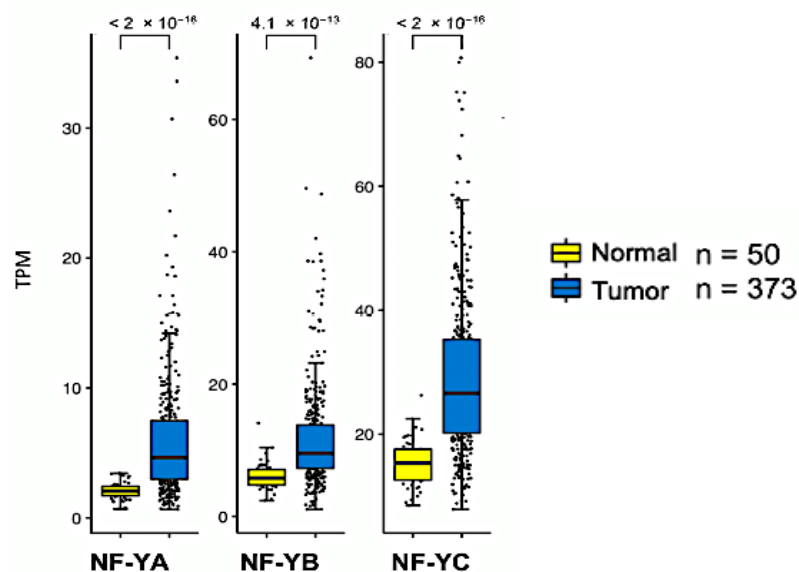


Figura 17: Aumento de expresión de las tres subunidades de NF-Y en CHC. Diagramas de caja de los niveles de expresión de las tres subunidades NF-Y a nivel génico medidos en MTP (Transcript per Millons).⁶⁷

Por su parte, SP1 es una proteína implicada en procesos biológicos normales y cancerosos como la diferenciación, el crecimiento celular, la apoptosis, la angiogénesis, la reprogramación celular y la tumorigénesis. La función la ejerce a través de su unión a zonas ricas en CG en un dominio dedos de zinc, como se ha visto en la secuencia de PNPT1.⁶⁸

Los dominios de unión al ADN de Sp1 incluyen tres dedos de zinc tipo C2H2 altamente homólogos, que se unen preferentemente al mismo sitio de consenso de GC [5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(G/T)-3']. Cada uno de los tres dedos de zinc en Sp1 tiene su propia preferencia de secuencia específica, y los tres son necesarios para una unión de alta afinidad, siendo el primer dedo de zinc el que tiene la mayor especificidad de secuencia. Curiosamente, la pérdida de los tres dedos de zinc Sp1 suprime no sólo la unión al ADN sino también la localización nuclear la cual requiere para coordinar las uniones en dicho dominio. Además, cabe destacar que el dominio cargado, aunque no es esencial para la unión al ADN, promueve la unión de los dedos de zinc al ADN diana.⁶⁹



Figura 18: Estructura del factor de transcripción Sp1. Destacamos el dominio de unión al ADN con los dedos de zinc Cys2His2 (violeta) y el dominio de transactivación (azul claro), compuesto por regiones ricas en serina/treonina flanqueadas por glutamina, localizados cerca del N-Terminal. El dominio de multimerización (beige) facilita la interacción entre múltiples moléculas Sp1 y promueve la superactivación de genes.⁷⁰

En esta revisión realizada en conjunto por los doctores Beishline y Clifford, se explica la importancia fundamental que tiene Sp1 para la regulación de genes cuyos productos son responsables de cada una de las ocho características principales del cáncer (“Hallmarks of cancer”). Asimismo, Sp1 puede establecer interacciones con múltiples proteínas reguladoras, desde otros factores de transcripción, hasta supresores tumorales y controlar de diversos modos la transcripción.⁷⁰

En pacientes con diversos tipos de cáncer, los niveles de Sp1 se encuentran elevados considerándose un factor de pronóstico negativo. Hay varios compuestos que alteran la regulación de las proteínas Sp influyendo en la interferencia directa con sus sitios de unión al ADN o promoviendo su degradación.⁷¹

La heterogeneidad de interacción de Sp1, junto con la cercanía entre las cajas GC y CCAAT en algunos promotores, sugiere la existencia de una asociación entre Sp1 y NF- κ B y, en consecuencia, su activación sinérgica.⁷²

Las modificaciones postraduccionales afectan en gran medida a la actividad de este factor de transcripción. Se ha observado en líneas celulares cancerosas que la expresión disregulada de este factor puede relacionarse con el proceso de transformación oncogénica.

73

La unión de factores de transcripción a tramos de ADN específicos en promotores de genes es un paso clave hacia la activación o represión transcripcional génica. Ya existen estudios que incluyen fármacos como antineoplásicos, AINEs, productos naturales, aspirina o metformina que podrían influir, a través de diversas vías, en la regulación negativa de las proteínas Sp. Por esta razón, en la actualidad un área clave de investigación sobre fármacos que se dirigen a las proteínas Sp abre las puertas a su consideración como agentes potenciales para futuras aplicaciones clínicas.⁷⁴

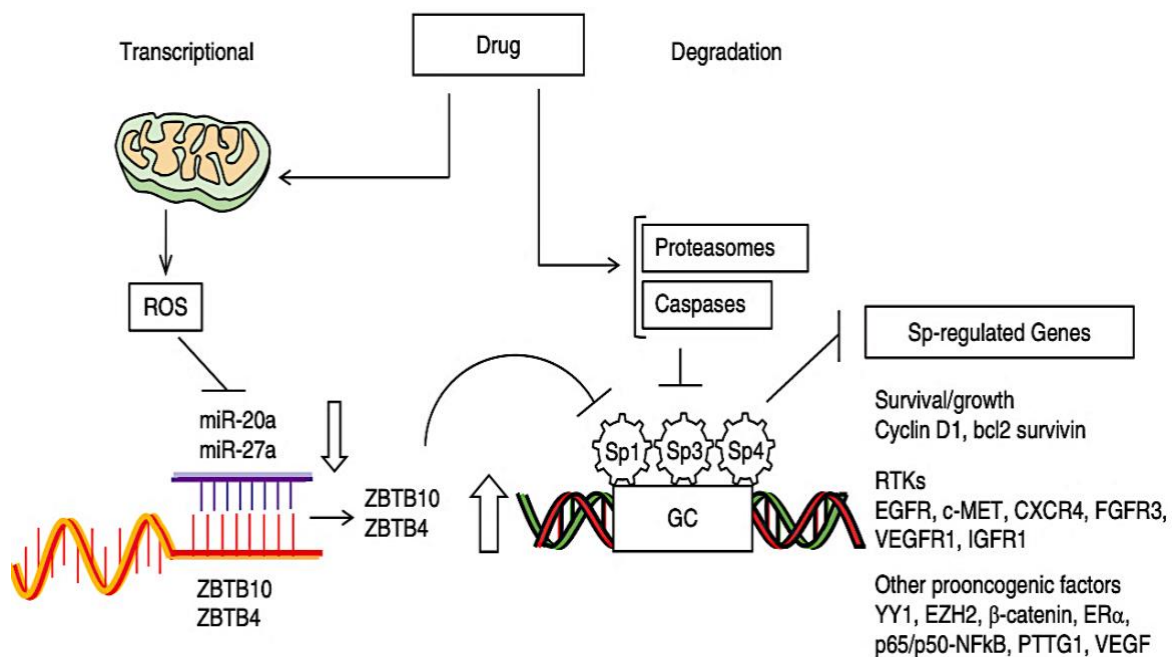


Figura 19: Mecanismos de regulación negativa del factor de transcripción Sp mediada por diversos fármacos.⁷⁴

En esta línea, se construye uno de los objetivos de este trabajo puesto que hay suficiente evidencia científica acerca de que la proteína Sp1 tiene un alto impacto e influencia a nivel funcional en el cáncer demostrando así su valía y gran potencial como posible diana terapéutica. Además, se ha visto que podemos hacer uso de fármacos para la influir en la regulación de los factores de transcripción objeto de estudio.

1.4. Relación NFY con Suramina

La Suramina, una naftilurea polisulfonada, es un potente inhibidor competitivo de la transcriptasa inversa que bloquea la infectividad y los efectos citopáticos in vitro. Presenta una amplia gama de aplicaciones potenciales como actividad antiparasitaria, antivírica y antitumoral y se ha utilizado hasta el momento como tratamiento antihelmíntico, frente al autismo y para tratar algunos tipos de cáncer.⁷⁵

El efecto sobre los niveles de heparanasa es el motivo de su reciente uso en cáncer, como el triple negativo de mama. La heparanasa es una enzima que degrada polisacáridos polisulfatados como el heparán sulfato (HS). El sulfato de heparán regula varios procesos relacionados con el cáncer, como la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos, la angiogénesis mediante el secuestro de factores de crecimiento endoteliales vasculares, la señalización de la vía hedgehog y la adhesión celular.⁷⁶

Además, HS es un componente importante de la matriz extracelular y de las membranas basales cuya degradación conduce a condiciones de inflamación, angiogénesis y metástasis tumoral. Una sobreexpresión de la enzima que la degrada condiciona un peor pronóstico y múltiples implicaciones en las funciones de crecimiento tumoral y habilidad para metastatizar lo cual ha traído un gran interés como posible diana antineoplásica.⁷⁷

En carcinoma hepatocelular, se han observado niveles altos de expresión de heparanasa que se correlacionan con fenotipos de alta capacidad invasiva (metástasis). Además, se ha visto que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento del gen de la heparanasa favorece el establecimiento de una red vascular (angiogénesis) que acelera el crecimiento tumoral actuando como un factor de crecimiento.⁷⁸

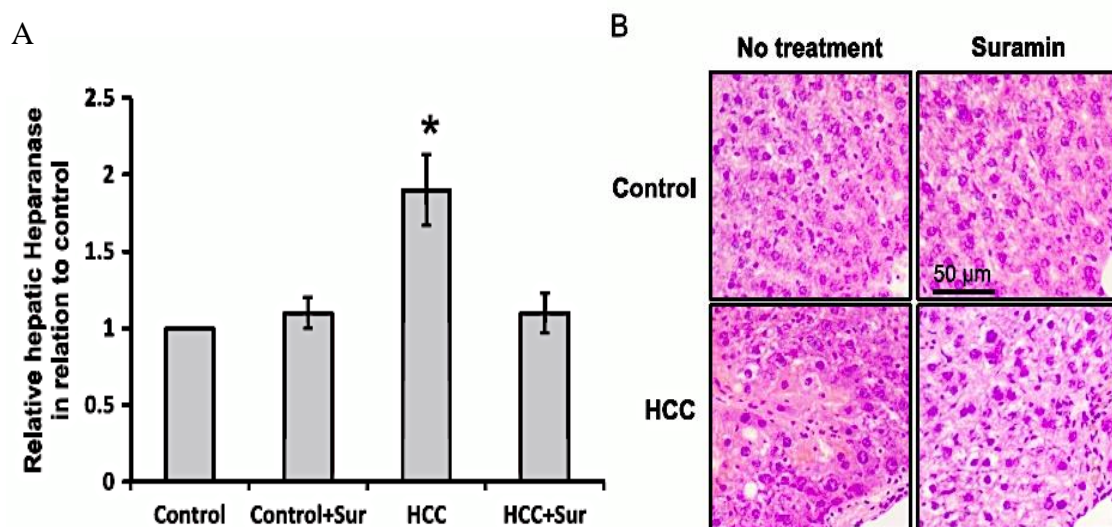


Figura 20: Efecto hepatoprotectores de la Suramina. A). CHC de ratas tratadas con Suramina que muestran una disminución significativa de la actividad de heparanasa en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). B). Imágenes representativas de secciones de hígado que muestran una considerable diferencia en cuanto al infiltrado celular en el tracto portal, fibrosis y rotura del tejido hepático que con el tratamiento de Suramina se ve atenuado.⁷⁸

De acuerdo con los resultados previos obtenidos mediante *Docking* por nuestro equipo de investigación junto con una exhaustiva búsqueda en la bibliografía disponible, se plantearon los fármacos Suramina y Micafungina (control positivo) para ensayar su efectividad sobre NF- κ B y Sp1, comprobando así su papel relevante en la regulación del promotor del gen PNPT1. Como ya hemos mencionado anteriormente, una sobreexpresión de este gen reduce considerablemente la esperanza de vida de los pacientes con cáncer hepatocelular o incluso inducirlo.

Este tipo de análisis *in silico* son esenciales e imprescindibles para el porvenir de la investigación científica ya que este tipo de resultados aceleran el trabajo de laboratorio, aunque son únicamente orientativos. En última instancia, son los propios ensayos en el laboratorio con los cuales se obtienen los datos más correctos para validar o desmentir cierta hipótesis planteada.

Debido al problema que plantea y la alta incidencia en nuestro medio del CHC surge la urgencia de buscar nuevos fármacos y medios eficientes para valorar el pronóstico de estos pacientes.

1.5. Modelos celulares experimentales: HeLa y HepG2

La línea celular inmortal HeLa corresponde a células de adenocarcinoma cervical humano con una alta capacidad de crecer y dividirse de manera indefinida por lo que se han convertido en una herramienta invaluable para la investigación científica médica. Fueron las primeras células humanas cultivadas en laboratorio y se obtuvieron a partir de una muestra de células cancerosas tomadas de *Henrietta Lacks* en 1951, de ahí su nombre. Se han utilizado en numerosos estudios, incluyendo la producción de vacunas, el desarrollo de medicamentos y en la comprensión de enfermedades como el cáncer y el VIH.⁷⁹

Algunas líneas celulares de hepatoma humano, como **HepG2**, Hep3B, HuH7 y HepaRG, se utilizan habitualmente para estudios sobre metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad.⁸⁰ Las líneas celulares se caracterizan por su vida útil ilimitada, fenotipo estable, alta disponibilidad y fácil manejo. Sin embargo, su principal limitación es la menor expresión de algunas actividades metabólicas en comparación con el uso *in vitro* de hepatocitos humanos primarios.⁸¹

Las células HepG2 son células no tumorigénicas y altamente proliferativas que se han cultivado con éxito en sistemas de cultivo a gran escala para estudiar diversas funciones hepáticas. Muestran una morfología epitelial cuando se cultivan sobre una superficie sólida y, en determinadas condiciones de cultivo, puede producirse la polarización de las células HepG2 con la formación de estructuras bilecanaliculares entre células adyacentes.⁸²

La línea HepG2 fue escogida para nuestro experimento en parte por las semejanzas con respecto al CHC en paciente reales, así como por la demostración en estudios previos de su implicación y relación con el factor NF-Y, objetivo de estudio de esta investigación.

Se han utilizado como modelo celular en estudios en los cuales se ha llegado a demostrar la importante implicación del factor de transcripción NF-Y en la regulación del crecimiento celular a distintos niveles y funciones celulares mostrados en la Figura 21. Testa et al plasma en este diagrama circular la gran variedad de vías genéticas identificadas en HepG2 que podrían ser evaluados como sustanciales reguladores del crecimiento celular y proceso oncogénico.⁸³

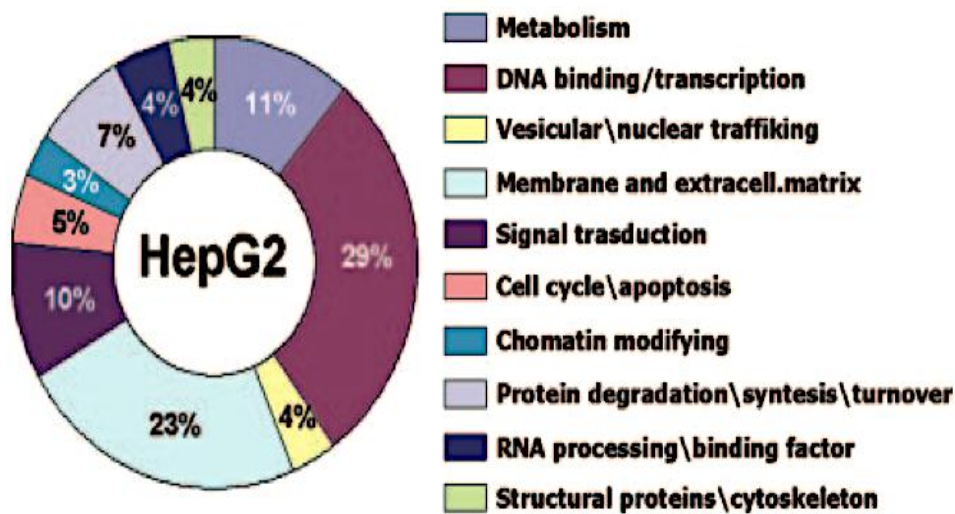


Figura 21: Clasificación funcional de los genes diana del NF-Y. Los genes diana del NF-Y cuya función es conocida o inferida se clasificaron según la función de la proteína codificada.⁸³

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Pese a la cantidad de directrices de cribado para la detección precoz y opciones terapéuticas de las que se dispone en la actualidad para el CHC, la mortalidad sigue en aumento. El mal pronóstico de estos cánceres se asocia principalmente a su diagnóstico tardío, lo que limita el acceso al tratamiento curativo. Por este motivo, resulta de vital importancia explorar la identificación de nuevos biomarcadores con fines pronósticos o predictivos, así como realizar más investigación en vías de desarrollar tratamientos de alto impacto en la práctica clínica.

El trabajo de nuestro laboratorio busca abrir una nueva vía en este sentido centrándonos en el gen PNPT1 como diana terapéutica, ya que los niveles de este tienen una correlación con el mal pronóstico del CHC de los pacientes.

Buscamos alterar la regulación del gen, incidiendo sobre factores de transcripción que se encuentran en el promotor de este gen, como NF-YA y SP1, los cuales ayudan a la transcripción de la translocasa PNPasa. Su silenciamiento podría aumentar los porcentajes de supervivencia en combinación con otras terapias.

HIPÓTESIS: La regulación del gen PNPT1 a través de la modulación de los factores de transcripción NF-YA y SP1 tendrá un impacto significativo en la viabilidad celular y la actividad mitocondrial en las células de hepatocarcinoma. Además, la administración de Suramina resultaría en una disminución de los niveles de PNPasa suponiendo efectos beneficiosos en el futuro tratamiento del cáncer hepatocelular, contribuyendo al desarrollo de terapias efectivas y de alto impacto clínico.

Objetivo 1: Caracterización del promotor del gen PNPT1 investigando el papel de los factores de transcripción NF-YA y SP1 en la regulación de la expresión génica.

Objetivo 2: Analizar los efectos de las alteraciones en los sitios de unión putativos de los factores de transcripción NF-YA y SP1 en la viabilidad celular y actividad mitocondrial.

Objetivo 3: Evaluar *in vitro* el impacto de la Suramina en la regulación de niveles de PNPasa en células de hepatocarcinoma y su posible aplicación terapéutica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se ha llevado a cabo en el laboratorio del Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno (CITSAM) ubicado en la tercera planta de la sede San Carlos Borromeo de la Universidad Católica de Valencia.

3.1. BIOINFORMÁTICA

3.1.1. Docking: Suramina y Micafungina (“GOLD”)

GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) es una herramienta utilizada para llevar a cabo el “Docking” que consiste en acoplar una proteína a una estructura concreta. Con su sistema se puede predecir si un ligando se une al sitio de unión de una proteína de interés y mediante el sistema de puntaje llamado PLP-Fitness se consigue un “score”. Cuanto más alto sea este valor, más probable será que ocurra la conformación adoptada por el ligando en la proteína en cuestión.

Para generar los ligandos en 2D se utilizó *ChemSketch*, un programa que permite dibujar la molécula manualmente o desde su código SMILES si es grande. En este caso, los ligandos Suramina y Micafungina, eran macromoléculas complejas, por lo que se obtuvieron sus códigos SMILES realizando una búsqueda en la base de datos *Drugbank*.

DrugBank es una base de datos bioinformática única la cual combina datos farmacológicos detallados sobre los compuestos con información de las dianas de los fármacos. Entre las aplicaciones se encuentra el descubrimiento *in silico* de dianas farmacológicas, predicción de las interacciones de fármacos y educación farmacéutica.⁸⁵

Una vez se obtuvieron los códigos SMILES de los compuestos que se querían testar como ligando, se abre el programa *ChemSketch*. En la barra del menú se clica “Generar” que abre un desplegable y se escogió la opción “Estructura a partir de SMILES”. Se introdujeron los códigos obtenido previamente y automáticamente el programa dibujó la molécula del compuesto deseado.

Una vez ya se posee tanto la molécula del factor de transcripción como las de los ligandos, lo que se debe hacer es abrir el programa Hermes-GOLD para acoplar ambas estructuras clicando “*run Docking*” y “*view solutions*” para que el programa muestre todas las posibles formas de unión del ligando al factor de transcripción que ha encontrado.

3.1.2. Curvas de Kaplan-Meyer

Los datos se descargaron del Human Protein Atlas (datos disponibles en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138035-PNPT1/pathology/liver+cancer>, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000001167-NFYA/pathology/liver+cancer>, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185591-SP1/pathology/liver+cancer>)

Las muestras de cancer del “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA) se analizaron a través de la secuenciación del ARN (*RNA-Seq*). Los niveles de expresión de ARNm se determinaron como FPKMs (número de fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas). En función del valor FPKM, los pacientes se clasificaron en dos grupos de expresión y se examinó la correlación entre el nivel de expresión y la supervivencia de los pacientes.

El pronóstico de cada grupo fue examinado mediante estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier y los resultados de supervivencia de ambos grupos fueron comparados mediante pruebas de rango logarítmico.

3.1.3. Mutagénesis dirigida

Para analizar de la secuencia del promotor del gen PNPT1 se hizo una búsqueda en la web del NCBI detectándose una serie de motivos putativos, así como sitios de inicio de transcripción de los cuales fueron algunos escogidos para modificar y crear mutantes. El objetivo de introducir mutaciones entre las secuencias de estos factores de transcripción fue determinar la afectación del nivel de expresión del gen PNPT1 cuando se modifican cada uno de los motivos o una combinación de estos (Anexo 1).

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Clonado y subclonado de las construcciones de ADN

La secuencia de 396 bp aguas arriba de la ATG de PNPT1 y los mutantes escogidos dentro de los factores de transcripción objeto de estudio, fueron sintetizados y clonados entre las posiciones KpnI y HindIII del plásmido *pUC57* (Genescript, Piscataway, NJ, EE. UU) como se muestra en la Figura 22.

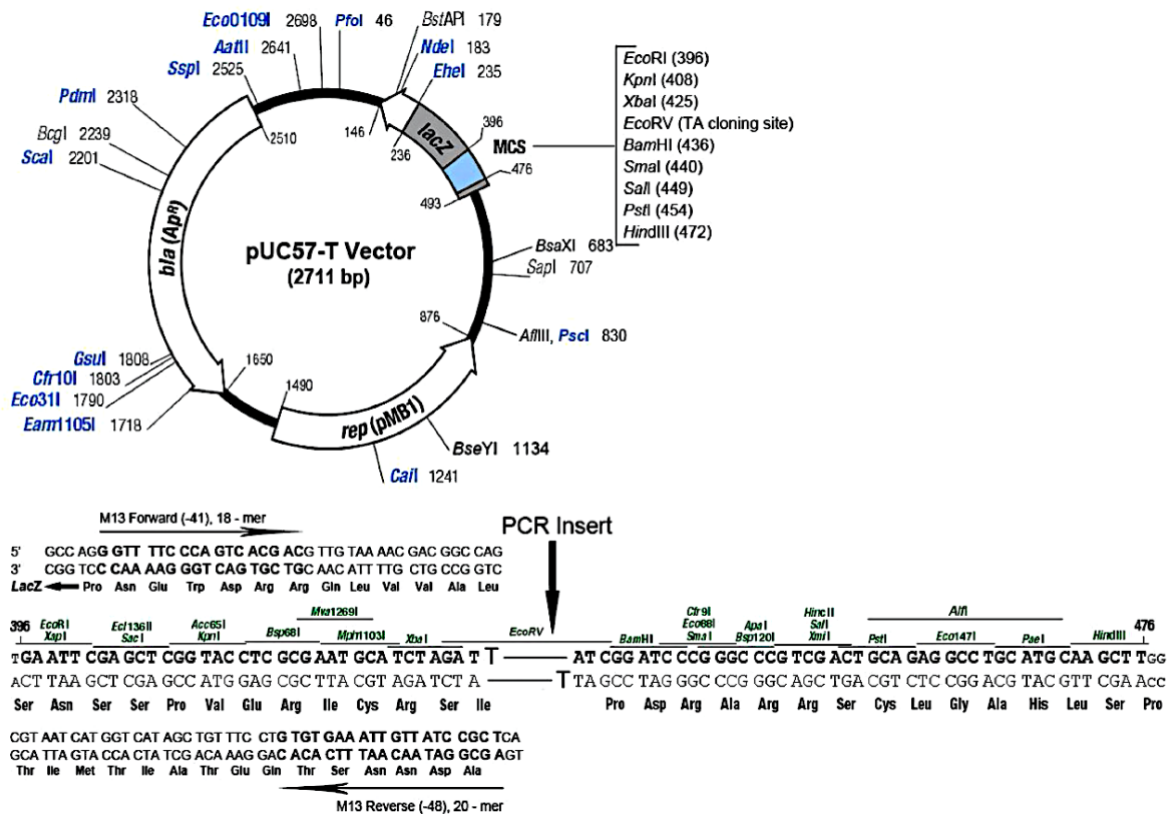


Figura 22: Mapa del Vector pUC57-T. Se indican los posibles sitios de unión para la ligación de aquellos insertos de interés que hayan sido cortados con dichas enzimas de restricción (Anexo 2).

Después de realizar una digestión con las enzimas de restricción correspondientes, se purificaron las bandas de las secuencias mutadas y el wild-type del promotor siguiendo el protocolo del kit “Clean Up” de Promega.

A continuación, las bandas purificadas se subclonaron en los sitios KpnI/HindIII del vector pGL4-Luc (Promega) mediante una ligasa T4 O/N en hielo a 16°C como se ejemplifica en el esquema de la figura 23.



Figura 23: Flujo de trabajo del proceso. Se llevó a cabo una digestión con las enzimas de restricción KpnI y HindIII para aislar las mutaciones objeto de estudio y poder purificarlas posteriormente mediante un protocolo de Promega con el fin de confirmar su correcta construcción y presencia. Fuente: Biorender.

Posteriormente, se transformaron estas construcciones en el pGL4-Luc con las bacterias termocompetentes DH5 α y se cultivaron en placas selectivas de LB Agar con ampicilina (100 g/mL). Las colonias aisladas se cultivaron en medio LB selectivo suplementado con ampicilina y se utilizaron los kits *PureYield™ Plasmid Miniprep* y *Midiprep* (Promega) para la purificación de plásmidos. La fidelidad de la región promotora de todos los clones se verificó mediante secuenciación.

3.2.2. Preparación de placas de agarosa y medio LB

En un matraz de 1L se mezcla 10g de LB Broth (C5001231) con 7,5 gr de agar bacteriological en 500mL de H2O reactiva. Con estas cantidades salen unas 25 placas aproximadamente. Tras disolver la mezcla en un frasco de cristal, introducimos en el autoclave a 121°C durante 1h. Posteriormente, se saca y se deja enfriar encima de la bancada. Bajo el halo aséptico proporcionado por el mechero Bunsen, se añade 250 μ L de Ampicilina (200 μ g/mL) para un volumen final de 500mL LB y se distribuye en diversas placas Petri dejando gelificar 30 minutos para su posterior uso en siembra de bacterias.

Siguiendo el mismo esquema, pero esta vez sin adicionar el gelificador (agar bacteriological) del medio LB Broth en 500mL de H2O reactiva prepararemos el medio LB sin antibiótico el cual será usado posteriormente en la transformación con las construcciones y las bacterias termocompetentes DH5 α .

3.2.3. Transformación Construcciones con DH5 α

Usando un recipiente en frío con hielo, se descongelan las bacterias termocompetentes DH5 α y colocamos las construcciones aisladas previamente por purificación en gel. Para un volumen total de 30 μ L, añadimos a unos tubos nuevos de Eppendorf 20 μ L de DH5 α , 19 μ L de H2O pura autoclavada y 1 μ L de la muestra con las construcciones aisladas. A continuación, sometemos la mezcla a un **choque térmico** siguiendo este esquema:

- 10 minutos a 4°C en hielo
- 2 minutos a 42°C en baño húmedo
- 10 minutos a 4° en hielo

Posteriormente, añadimos hasta 1000 μ L (970 μ L) de medio líquido LB sin ampicilina y dejamos en agitación a 250 rpm durante 1h a 37°C.

Pasado este periodo de tiempo, en el puesto de cultivo de bacterias y bajo el halo estéril del mechero de Bunsen, sembramos el contenido de nuestra mezcla chocada en unas placas preparadas con medio LB con Ampicilina. Distribuimos una cantidad de 100 μ L en una de las placas y el Resto (900 μ L) en otra distinta. Dejamos incubar O/N a 37°C en una estufa.



Figura 24: Esquema del proceso de transformación bacteriana. Los constructos purificados insertados en el vector pGL4-Luc se introducen en las bacterias termocompetentes denominadas DH5 α . Fuente: Biorender.

3.2.4. Transfección de los mutantes del promotor y ensayo de Luciferasa

Los ensayos reporteros de luciferasa se realizaron con células *HeLa* por su gran evidencia científica en alta eficacia en este tipo de procesos.⁷⁹ Las transfecciones se realizaron con FuGENE (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. El día anterior a la transfección, las células *HeLa* se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad que permitiera a las células alcanzar una confluencia del 60-70% en el momento de la transfección (6000-7000 células por pocillo). Se utilizaron medios de cultivo frescos sin antibióticos. Posteriormente a la transfección de las células, se midió la actividad máxima de la luciferasa en los lisados.

Las actividades de luciferasa se determinaron utilizando un luminómetro Victor X5 (*Perkin Elmer*), con un periodo de medición de 0,5 segundos. Las actividades se expresaron como valores relativos de la actividad máxima, considerando la actividad del constructo promotor de tipo salvaje (396bp-PNPT1-promluc) como el 100% y la actividad de un vector vacío (sin promotor) como el 0%.

3.2.5. Transfección de sondas de siARN

Las cotransfecciones de 396bp-PNPT1-prom-luc y las sondas de siARN comerciales (*Ambion*) se realizaron también en las células *Hela* cultivadas en placas de 12 pocillos con *Lipofectamina RNAiMax* (*Reactivo para transfección Lipofectamine™ 2000; Invitrogen*). La actividad luciferasa se analizó como se ha descrito anteriormente.

3.2.6. Cultivos celulares

3.2.6.1. Preparación del medio completo

Los cultivos celulares de células HeLa fueron realizados con medio mínimo esencial de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; GibcoBR) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Waltham, MA, USA) 2mM de glutamina y 1% de Penicilina-Estreptomicina (Ps; 10.000 U/mL; Gibco).

Las líneas celulares de HepG2 se cultivaron en medio reducido RPMI 1640 (1X) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Waltham, MA, USA) 2mM de glutamina y 1% de Penicilina-Estreptomicina (Ps; 10.000 U/mL; Gibco).

Ambos tipos celulares se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂.

3.2.6.2. Mantenimiento celular

Para su mantenimiento, se quitaba el medio antiguo, se lavaba con 2 mL de DPBS 1x dos veces y se levantaban con 1 mL de Tripsina-EDTA 1x. Pasados unos 10 minutos a 37°C se le añadían 5 mL de medio (Volumen total de 6mL) y se procedía a levantar las células dividiendo la cantidad en dos frascos de mantenimiento. Se ponían 3mL en cada uno de ellos y se completaba con medio completo nuevo hasta 6mL.

Dejábamos crecer durante 48h para tener una reserva celular suficiente para nuestros posteriores experimentos.

3.2.6.3. Siembra de HepG2 en placas 6-wells.

Cogemos un frasco de mantenimiento de las células HepG2, quitamos el medio antiguo, lavamos con DPBS 1x dos veces y ponemos 1mL de Tripsina-EDTA 1x para levantar las células. Añadimos 4 mL y pasamos el volumen final de 5mL a un tubo de 15mL para centrifugarlo a 500 g durante 10 minutos.

Una vez centrifugado, descartamos el sobrenadante y diluimos el pellet en 1mL de medio RPMI completo. Para contar las células y cultivar cantidades precisas en nuestra placa 6W, necesitamos hacer uso del aparato LUNA II™. Para ello, se mezclaron 10 µL de cultivo celular + 10 µL de Tripán blue (Figuras 25 y 26).

Como el objetivo era dispensar 1.000.000 de células por pocillo, partiendo de la cantidad mostrada por el LUNA II™ y sabiendo que cada placa tiene 6 pocillos en el cual queríamos disponer de un volumen total de 1mL en cada uno de ellos, se calculan las cantidades necesarias de células a distribuir completando con medio.

Ejemplo: $6,80 \times 10^6$ células/mL \rightarrow 147 μ L de células y 853 μ L de RPMI por pocillo.

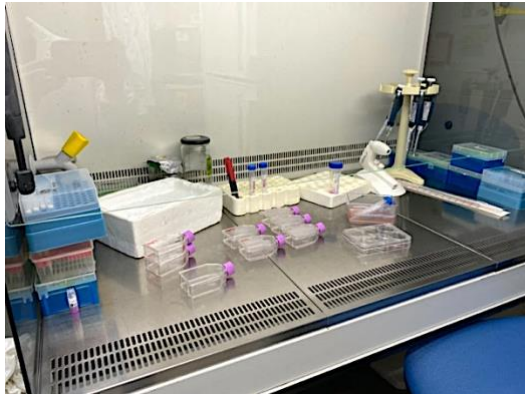


Figura 25: Proceso de contaje celular. Obtención de células a partir de frasco de mantenimiento y distribución en placa de 6 pocillos para preparación del estudio con el fármaco Suramina.

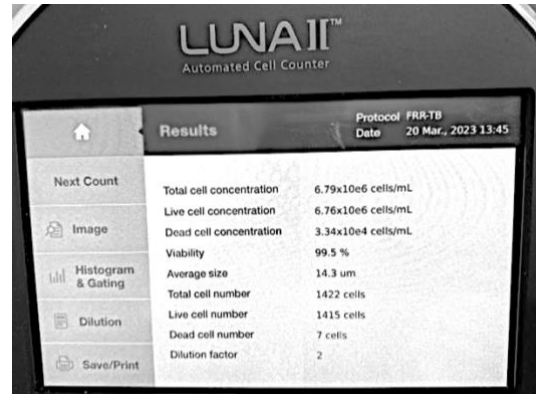


Figura 26: Resultados del LUNAII, un contador de células automático. Muestra de células HepG2 indicándose la concentración total, las vivas, las muertas y su viabilidad en porcentaje.

3.2.6.4. Lisado celular y cuantificación de proteínas

En el caso de la línea celular HepG2, tras el tratamiento correspondiente, debíamos lisar las células y procesarlas para posteriormente analizarlas mediante un western blot objetivando así la presencia o no de proteínas. Para realizar los lisados celulares, necesitábamos trabajar nuestras muestras en condiciones de 4°C con hielo.

Primero, se quita el medio antiguo, se lava con DPBS y se le añade 1mL de Tripsina-EDTA 1x para levantar las células. Dejamos actuar 10 minutos, añadimos 1ml de DPBS y levantamos las células con la ayuda de un *scraper* traspasando el volumen total de 2 mL a un tubo de 15mL para centrifugar a 500 g durante 10 minutos a 4°C.

Se desecha el sobrenadante y el pellet de células se resuspende en 1ml de buffer de lisis de células eucariotas (20mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 1% Tritón x100, 0,10% SDS y 2mM EDTA) y 100 μ L de PMSF 10 mM para inhibir las proteasas.

Para concluir, se centrifuga a 500 g durante 10 minutos a 4°C descartando el pellet y rescatando el sobrenadante pudiéndose congelar a -20°C hasta su uso.

Con el objetivo futuro de realizar una inmunotransferencia era preciso cuantificar las proteínas del lisado con una técnica fiable como es el método Bradford con BSA como estándar. Seguimos los valores de la siguiente tabla para obtener la curva patrón de comparación para nuestras muestras:

Tabla 1: Volúmenes de BSA y agua empleados para construir de la curva patrón

μg de BSA	0	1	2,5	5	7,5	10	12,5
Volumen de BSA (μl)	0	0,5	1,25	2,5	3,75	5	6,25
Volumen de H ₂ O (μl)	1000	999,5	998,75	997,5	996,25	995	993,75

Para la preparación de las muestras se añadió 1 μl de lisado en 999 μl de agua para conseguir un volumen de fracción proteica final de 1mL. Posteriormente, tanto a las muestras preparadas como al estándar de BSA se le insertó 1mL de *Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent de Bio-rad* para que hiciera la reacción pertinente.

Finalmente se cuantificó las proteínas mediante espectrometría haciendo uso del programa *Nanodrop 2000 de ThermoScientific*.

3.2.7. Western blot

En primer lugar, preparamos 2 geles con las siguientes cantidades de reactivos:

Tabla 2: Cantidades de reactivos utilizados para preparar 2 geles de acrilamida (1mm)

REACTIVOS	GEL SEPARADOR (12%)	GEL CONCENTRADOR
H ₂ O	6952 μL	4384 μL
Buffer TRIS-HCl	4000 μL	2688 μL
Acrilamida 40%	4800 μL	800 μL
SDS 10%	160 μL	80 μL
APS 10%	80 μL	40 μL
TEMED	8 μL	8 μL

Se procede a colocar los cristales de electroforesis añadiéndose primero la mezcla preparada del “running” dejando gelificar unos 45 minutos. Posteriormente, se añadió la mezcla del “stacking” llegando hasta el borde superior y colocándose los peines entre los cristales. Tras 30 minutos se retiraron los peines y se dispusieron los cristales con los geles dentro del cassette para electroforesis. Añadimos el running buffer por el interior de la estructura para comprobar que no hubiera fugas y se cargaron tanto el marcador de peso molecular como las muestras a testar. Se conectó a la fuente con un voltaje de 200V durante 45 minutos aproximadamente.

Una vez terminó la electroforesis, uno de los geles se procedió a teñir con azul de Coomassie (0,1% Coomassie, 10% ácido acético y 50% metanol) con el fin de observar las proteínas presentes en el gel de electroforesis previamente. Se dejó tiñendo en agitación durante 2 horas y posteriormente se preparó solución desteñidora que contenía 2% de ácido acético, 35% de metanol. Se dejó en el agitador hasta que el gel se destiñó completamente.

Al mismo tiempo, el otro gel preparado se utilizó para realizar la transferencia en una cubeta con buffer de transferencia 1X. La membrana se activó con Metanol durante unos segundos y después se sumergió en TBST 1X al igual que el papel Whatman 0,45 μm y las esponjas. Para el ensamblaje, se montó con el siguiente orden: panel negro (cátodo -), esponja, 2 papeles Whatman, membrana, gel, 2 papeles Whatman, esponja y el panel blanco (ánodo +). Todo el ensamblaje se introduce en la cubeta con el buffer de transferencia 1X y se aplicó una corriente de 30V dejándose O.N.

A continuación, las membranas se bloquearon con BSA al 3% en 1X-PBS durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente. Después, se procedió a incubar con el anticuerpo anti-Mouse IgG primario diluido 1:1000 durante 1 hora. Posteriormente, se lavaron con TBST 1X durante 10 minutos en 3 tandas y se incubaron de nuevo con un anticuerpo secundario HRP Mouse IgG diluido 1:25.000 durante 30 minutos y se volvió a realizar 3 lavados con TBST 1X durante 10 minutos.

Finalmente, para observar la inmunotransferencia se procedió al uso de luminol añadiendo 500 μL de solución de peróxido (Ref # 1859701, ThermoScientific) y 500 μL de la solución potenciadora de luminol (Ref # 1859698, ThermoScientific) esperamos 1 minuto a que actúe y revelamos en *ImageQuant LAS 4000 mini Biomolecular Imager de GE Healthcare*.

3.2.8. Análisis de la actividad mitocondrial con Resazurina

Para analizar la actividad mitocondrial en las células HepG2 tratadas previamente con Suramina y Micafungina, se añadió un 10% del *volumen* final de Alamar Blue según el protocolo (Ref # B21187.06, Thermo Fisher Scientific) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos y 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a leer los niveles en el lector de microplacas *Perkin Elmer Victor X5 2030 Multilabel Microplate Reader*.

3.2.9. Inmunohistoquímica

La técnica de Inmunohistoquímica se realizó de forma automatizada con el inmunoteñidor AutostainerLink 48 (Dako-Agilent) siguiendo el protocolo de inmunotinción que consiste primero en un bloqueo con peroxidasa (*Dako-Agilent*) durante 5 minutos. Luego se procedió a la incubación con unos anticuerpos monoclonales (Polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano e inmunoglobulinas anti-ratón) durante 20 minutos. A continuación, se añadió solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina con peróxido de hidrógeno durante 10 minutos y una contratinción con hematoxilina (*Dako-Agilent*) durante 15 minutos.

Por último, se procedió a la deshidratación, aclaramiento y montaje de la laminilla y captura de imagen con el escáner Aperio CS2 y el visor Aperio ImagenScope, ambos de Leica Biosystems.

Tabla 3: Descripción de los anticuerpos utilizados. Compañía comercial, clon, tipo de anticuerpo y dilución de los anticuerpos frente a PNPasa, NF-YA y SP-1

Anticuerpo 1º	Compañía	Código/clon	Especificidad	Tipo	Dilución
PNPasa	Santa cruz Biotechnology	Sc-271479	Monoclonal	Anticuerpo de ratón	1:100
NF-YA		Sc-17753			1:100
SP-1		Sc-420			1:50

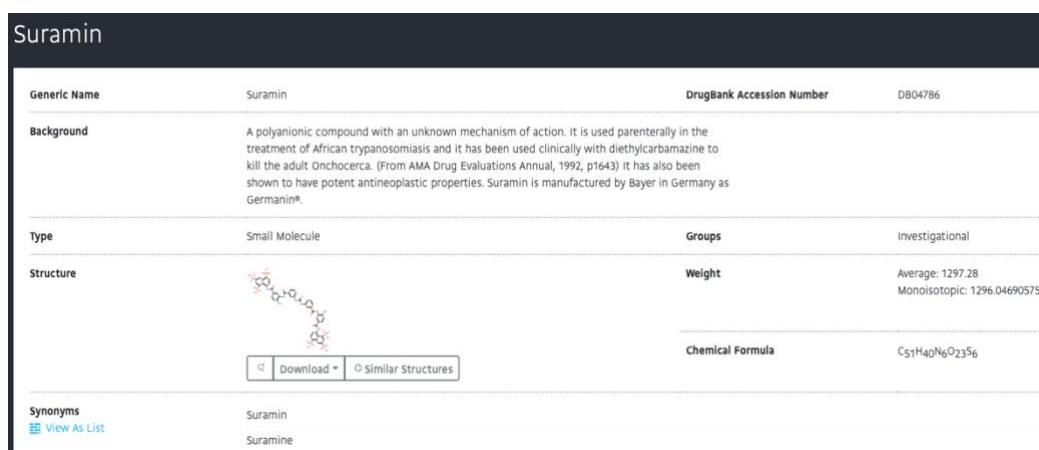
4. RESULTADOS

4.1. Resultados de Bioinformática

Para poder proceder a realizar el trabajo en el laboratorio, previamente se debía hacer un estudio *in silico* el cual permitiera buscar y demostrar la evidencia o existencia de algún fármaco cuya estructura tridimensional se acoplara con el gen, y su correspondiente proteína, objetivo a estudio PNPT1. Para ello, se hizo uso del programa GOLD que nos permitió hacer el Docking en busca de dicho fármaco.

Así mismo, era preciso realizar un análisis de supervivencia de los pacientes con hepatocarcinoma, tanto con exposición o no al virus de la hepatitis C (VHC), para corroborar la relevancia en la exploración de nuevas dianas terapéuticas.

4.1.1. Docking (Hermes-GOLD)




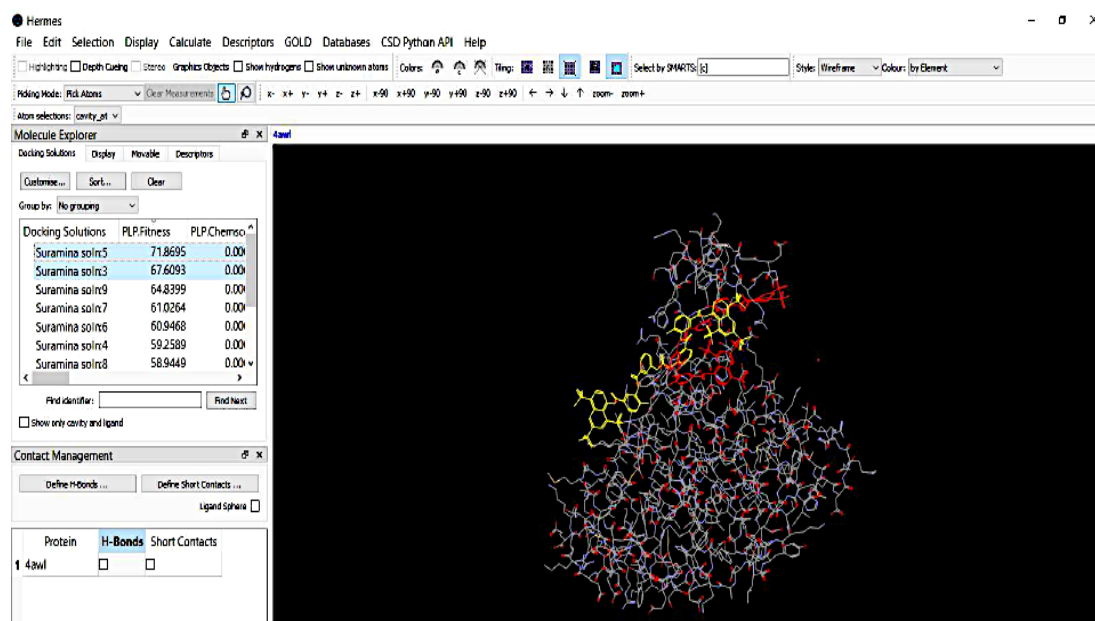
Generic Name	Suramin	DrugBank Accession Number	DB04786
Background	A polyanionic compound with an unknown mechanism of action. It is used parenterally in the treatment of African trypanosomiasis and it has been used clinically with diethylcarbamazine to kill the adult Onchocerca. (From AMA Drug Evaluations Annual, 1992, p1643) It has also been shown to have potent antineoplastic properties. Suramin is manufactured by Bayer in Germany as Germanin®.		
Type	Small Molecule	Groups	Investigational
Structure		Weight	Average: 1297.28 Monoisotopic: 1296.046905756
Synonyms	Suramin Suramine	Chemical Formula	C ₅₁ H ₄₀ N ₆ O ₂₃ S ₆

Figura 25: Búsqueda del fármaco Suramina en la base de datos Drugbank. Incluye información acerca del nombre genérico del fármaco, una breve explicación del uso habitual, la estructura tridimensional, así como su peso y fórmula química. <https://go.drugbank.com/drugs/DB04786>



Docking Solutions	PLP.Fitness	PLP.Chemiso
Suramina soln5	71.8695	0.00
Suramina soln3	67.6093	0.00
Suramina soln9	64.8399	0.00
Suramina soln7	61.0264	0.00
Suramina soln6	60.9468	0.00
Suramina soln4	59.2589	0.00
Suramina soln8	58.9449	0.00

Figura 26: Resultados del Docking empleando Suramina como ligando. En rojo se encuentra el valor en "score" más alto y en amarillo el segundo más alto. El factor de transcripción está representado en color gris.

4.1.2. Análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier

Se representan las gráficas de supervivencia Kaplan-Meier en función de la expresión de los distintos genes y factores de transcripción estudiados en esta investigación y diferenciando dos grupos de pacientes con CHC, los expuestos y no expuestos al virus de la

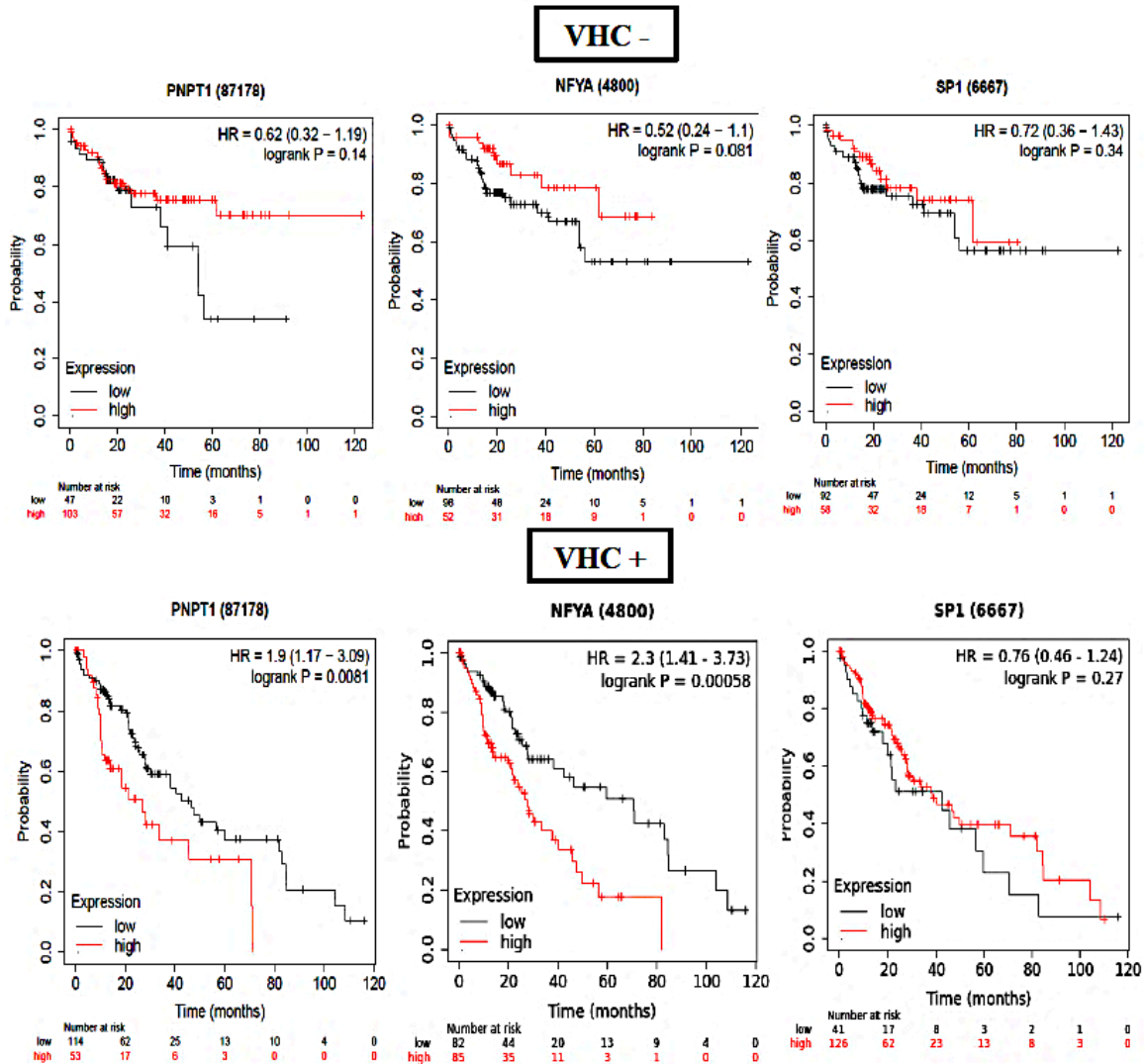


Figura 27: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en paciente CHC. Se clasifican los individuos por etiología vírica o no y según la expresión alta o baja de los niveles de expresión de ARNm de las muestras de tejidos cancerosos analizados. Los datos fueron obtenidos del Human Protein Atlas disponibles en <https://v21.proteinatlas.org> y realizando una búsqueda por genes de interés.

El modelo celular Hela se ha utilizado para probar los mutantes de diversos clonados establecidos para estudiar el papel del promotor del PNPT1 en relación con los factores de transcripción comentados previamente. Al mismo tiempo, ha servido para realizar estudios de viabilidad celular y ensayos de luciferasa tras la transfección con el fin de determinar la actividad mitocondrial al modificar dichos factores.

Por otra parte, la línea celular HepG2 ha sido empleada como modelo experimental para probar los efectos del fármaco Suramina comparándolos con la Micafungina como control negativo. Comprobaremos cómo se modifican los niveles de expresión de la PNPasa según la dosis administrada de los mismos basándonos en un ensayo de citotoxicidad previo que determinó una concentración de 80uM-100uM como valor diana a testar.

4.1.3. Análisis del promotor del gen PNPT1 y construcción de mutantes

El análisis de la secuencia del promotor del gen PNPT1 fue obtenida de la página web NCBI. Con las aplicaciones en línea MatInspector y Promo se analizaron los nucleótidos del 4692 al 5095 de la secuencia de referencia NCBI NG_033012.1. El análisis reveló un “elemento de respuesta interferón sensible” (ISRE), un sitio de unión putativo del factor de transcripción NFY (CCAAT) y cajas GC (CCGCCC) donde se incluye el sitio de unión putativo del factor de transcripción SP1.

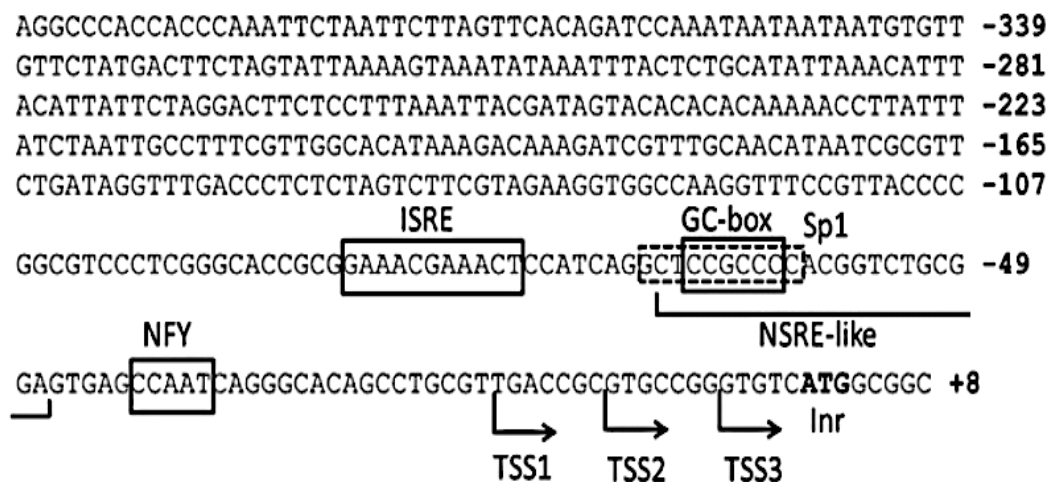


Figura 28: Motivos putativos del promotor humano de PNPT1. Los sitios de unión ISRE, GC-box y NFY están resaltados con recuadros sólidos, y el sitio de unión putativo SP1 con un recuadro punteado. La secuencia NSRE está subrayada y la ATG inicial (Inr) aparece en negrita. Se muestran los sitios de inicio de la transcripción (TSS) señalados anteriormente.

De esta manera se determinó la presencia de unos sitios de unión de factores de transcripción, los cuales eran de interés para nuestro estudio. A partir de esta información obtenida se mandaron a construir unos mutantes en cada una de estas posiciones con el fin de estudiar las modificaciones en los niveles de expresión del gen PNPT1. Dichas mutaciones se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 4: Secuencia nativa (WT) y mutantes en los nucleótidos -96 a -1 de la región promotora de PNPT1. Los nucleótidos mutados se muestran en rojo.

Construct	Nucleotides -96 to -1 (Mutations in Red)
WT	GGGCACCGCGGAAACGAAACTCCATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCG GAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
ISRE mut	GGGCACCGCGCAACTAGAACTCCATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCG GAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
SP1 mut	GGGCACCGCGGAAACGAAACTCCATCAGGCTCCGAAACACGGTCTGCG GAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
NRSE mut	GGGCACCGCGGAAACGAAACTCCATCAGGCTCCGCCCCAAAATCTGCG GAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
CCAAT mut	GGGCACCGCGGAAACGAAACTCCATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCG GAGTGAGCCAAACAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
CCAAT+SP1 mut	GGGCACCGCGGAAACGAAACTCCATCAGGCTCCGAAACACGGTCTGCG GAGTGAGCCAAACAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
ISRE+NFYA mut	GGGCACCGCGCAACTAGAACTCCATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCG GAGTGAGCCAAACAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
ISRE+SP1+NFYA mut	GGGCACCGCGCAACTAGAACTCCATCAGGCTCCGAAACACGGTCTGCG GAGTGAGCCAAAACAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
ISRE+SP1+NRSE+NFYA mut	GGGCACCGCGCAACTAGAACTCCATCAGGCTCCGAAACCAAAAATCTGCG GAGTGAGCCAAAACAGGGCACAGCCTGCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

4.2. Resultados experimentales

4.2.1. Análisis de elementos *cis* y las construcciones del promotor PNPT1

La contribución de los distintos elementos de ADN a la actividad promotora de PNPT1 se evaluó mediante ensayos de luciferasa con FuGENE en células HeLa. Se hizo uso de un constructo reportero de luciferasa de luciérnaga que contenía una región promotora de PNPT1 de 396 pb y los constructos elaborados que contenían mutaciones puntuales de los cuatro elementos objeto de estudio previamente comentados.

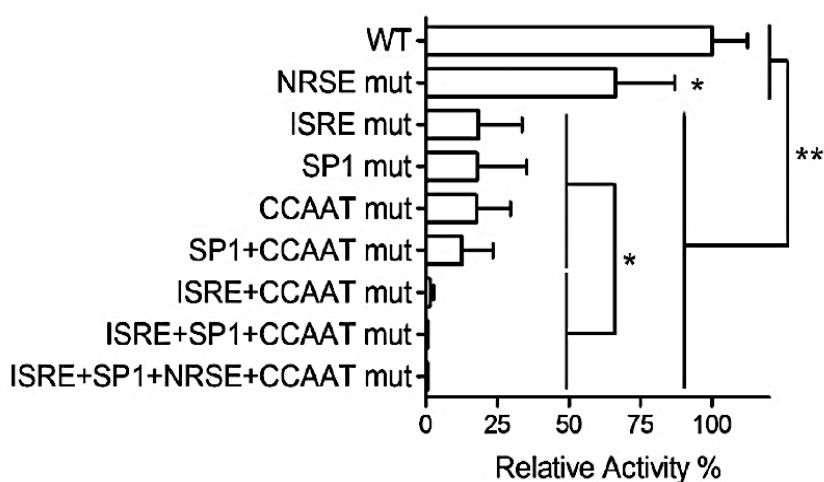


Figura 29: Análisis mutacional de los motivos predichos del promotor humano de PNPT1. Las células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido reportero de luciferasa que contiene 396bp del promotor PNPT1 y plásmidos derivados que contienen segmentos deletéreos de los motivos indicados. Las actividades se midieron 48h post-transfección y se expresaron como valores relativos de la actividad máxima. Se consideró la actividad del constructo promotor de tipo salvaje “WT” (396bp-PNPT1-promluc) como el 100% y la actividad del vector vacío (sin promotor) como el 0%. Análisis estadístico: ANOVA / Tuckey: * p < 0,05; ** p < 0,01; n = 6 (3 ensayos por duplicado)

4.2.2. Ensayo de Luciferasa y Silenciamiento génico

Para analizar el impacto de la actividad transcripcional del promotor de PNPT1 y los niveles de expresión de SP1 y NFYA, se utilizaron siRNAs específicos de SP1 (10 nM) y NFYA (50 nM) y se testaron mediante ensayos con luciferasa con el constructo de promotor de PNPT1 de tipo salvaje de 396 pb.

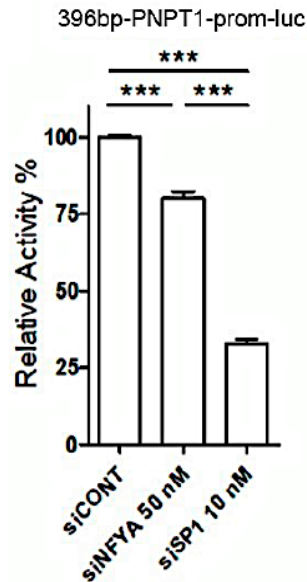


Figura 30: Efectos de la silenciación de SP1 y NFYA sobre la actividad promotora de PNPT1 en células Hela. Las células HeLa se transfectaron junto con el plásmido PNPT1 prom-luc de 396 pb y los silenciadores indicados. La actividad de luciferasa se midió en lisados celulares de Hela y se expresó como unidades relativas (%) respecto a las células control. Análisis estadístico: ANOVA / Tuckey: *** $p < 0,001$; $n = 8$ (2 ensayos por cuadruplicado).

4.2.3. Actividad mitocondrial con Resazurina

El ensayo con Resazurina con células Hela se llevo a cabo para objetivar si la actividad mitocondrial disminuye o aumenta cuando NFYA se encuentra silenciado. Para el estudio se usaron 3 grupos de células HeLa, dos controles y un grupo celular al que se le había silenciado NFYA. A su vez, se llevó a cabo el mismo ensayo midiendo la actividad mitocondrial a diferentes tiempos, a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

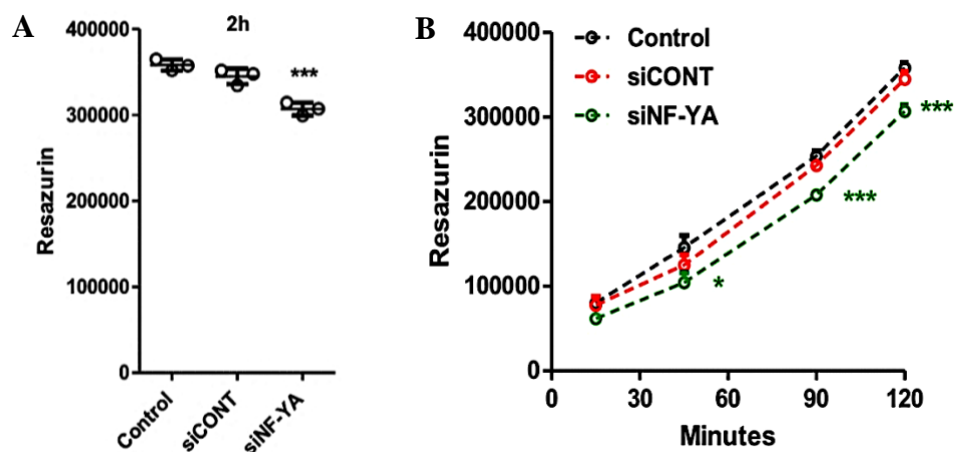


Figura 31: Gráficas representativa de los niveles de Resazurina obtenidos en el ensayo sobre los tres grupos celulares testados: dos controles y uno con NFYA silenciado. A: Medición a un tiempo concreto de 2 horas. B: Ensayo valorado a lo largo de varios tiempos: 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

Por otra parte, para evaluar la influencia del fármaco a testar sobre la actividad mitocondrial, también se llevó a cabo un ensayo con Resazurina en células HepG2 tratadas con distintas concentraciones de Suramina y Micafungina y a distintos tiempos. Este ensayo de dosis-respuesta fue llevado a cabo previamente por un miembro del grupo de investigación determinándose como significativos, en cuanto a reducción de la actividad mitocondrial, unos valores entre 80-100 μM . Se compararon los niveles de fluorescencia de Suramina con Micafungina como control negativo a los tiempos 0, 30 minutos y 1 hora.

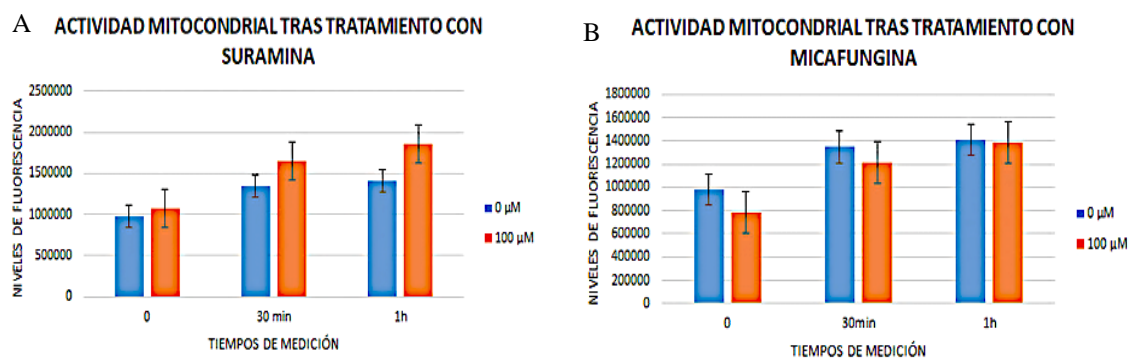


Figura 32: Representación gráfica de los datos obtenidos en el ensayo dosis-respuesta. Se evalúa la actividad mitocondrial según los niveles de fluorescencia obtenidos por un ensayo con Resazurina en las células tratadas con diversas concentraciones: 0 μM y 100 μM de Suramina (A) Micafungina (B) respectivamente.

4.2.4. Estudio semicuantitativo de niveles de PNPasa mediante Western Blot

Los cultivos tratados con Suramina y Micafungina fueron lisados y se procedió a la extracción de proteínas para analizar los niveles de PNPasa y compararlos con los resultados obtenidos en los ensayos de dosis-respuesta de actividad mitocondrial.

En la figura 35 se puede comprobar que en las células HepG2 tratadas con una concentración de 100 μM de ambos tratamientos aparecen las bandas correspondientes a la PNPasa cercanas a los 70KDa. El análisis de los tratamientos de los cultivos con Suramina y Micafungina sirven para valorar los niveles de PNPasa, así como para comprobar si coinciden con los resultados obtenidos en los ensayos de dosis-respuesta con Resazurina. Los cultivos fueron tratados previamente con 0 μM y 100 μM dejándose en incubación durante 24h para su posterior extracción de proteínas y realización de un Western Blot.

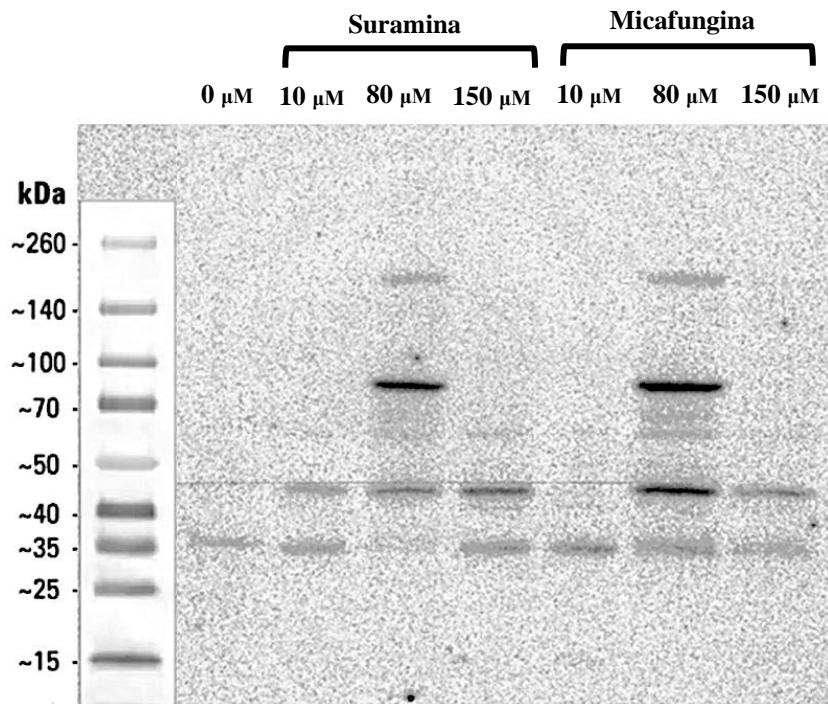


Figura 33: Niveles de proteínas analizados mediante Western blot. Análisis de los lisados de HepG2 tras el tratamiento con Suramina y Micafungina a diversas dosis analizadas en el ensayo de dosis-respuesta previos (0 μ M, 10 μ M, 100 μ M y 150 μ M).

4.2.5. Inmunohistoquímica con anticuerpos primarios de PNPasa, NF-YA y SPI en muestras de pacientes con CHC

Con el fin de darle un enfoque más pragmático a nuestro proyecto, se procedió a realizar un estudio de inmunohistoquímica (IHQ) con muestras reales de pacientes con cáncer hepático. Las muestras fueron obtenidas tras la lectura de historias clínicas y selección de dichos pacientes procedentes del Hospital La Fe gracias a un convenio de colaboración con un grupo de investigación y tras la obtención favorable de un dictamen del comité de ética que se adjunta en el Anexo 3.

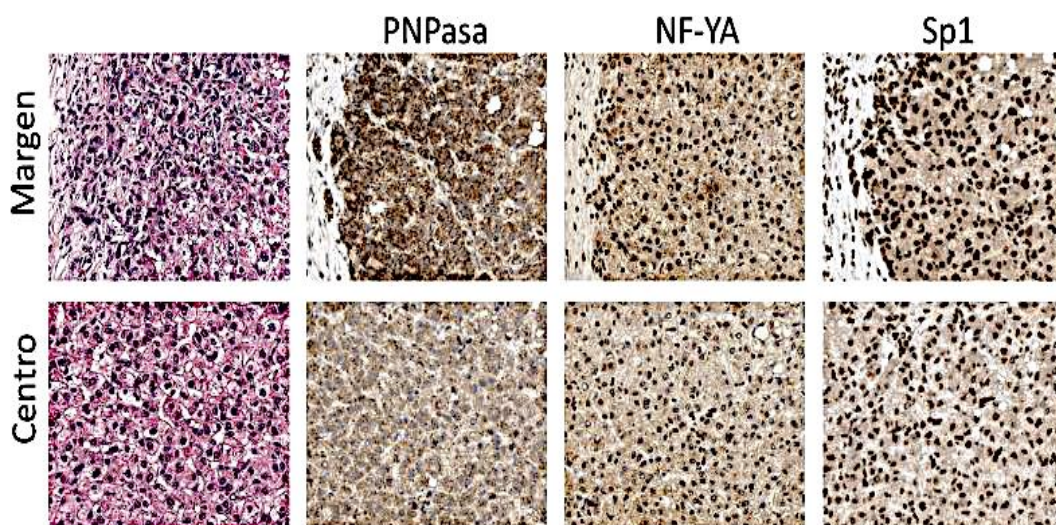


Figura 34: Estudio IHQ de las proteínas PNPasa, NF-YA y SPI en muestras de pacientes con cáncer hepatocelular. Se diferencian los niveles de dichas proteínas tomando muestras tanto del centro tumoral como del margen o zonas periféricas.

5. DISCUSIÓN

El CHC es tipo predominante de neoplasia hepática primaria y se asocia con frecuencia a elevadas tasas de mortalidad, especialmente en pacientes con antecedentes de cirrosis hepática. En la actualidad, la terapéutica del CHC incluye diversos abordajes, siendo la terapia combinada de los fármacos Atezolizumab y Bevacizumab la alternativa al tratamiento sistémico convencional más prometedora del mercado hasta el momento en la población adulta.⁸⁵ Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de encontrar nuevos parámetros o marcadores para el estudio de progresión y pronóstico de este tumor.

A lo largo de la última década, se han publicado múltiples investigaciones que revelan que NF-YA se encuentra sobreexpresada en diversos tipos de cánceres, sobretodo los de tipo epitelial como el carcinoma hepatocelular.⁸⁶ Dado que el CHC es la sexta neoplasia maligna más frecuente y la cuarta causa de muerte por cáncer en todo el mundo urge la necesidad de investigar más sobre posibles marcadores que definan el pronóstico de estos pacientes y futuras dianas terapéuticas.⁸⁷

Inicialmente, tras revisar la bibliografía acerca de los cuatro factores de transcripción encontrados en el promotor del gen PNPT1, principalmente se escogió NF-Y como diana de estudio, puesto que el factor SP1 ya ha sido analizado con anterioridad en varios estudios, y no se encontró bibliografía suficiente acerca de ISRE y NRSE. Debido a la alta relación de este factor de transcripción con el desarrollo de tumores y al resto de razones anteriormente expuestas, se decidió emplear NF-Y para indagar in silico la existencia de sustancias con sitios de unión para dicho factor. Se confirmó la existencia de un compuesto cuyo sitio de unión al factor de transcripción NF-Y se pudo aislar y proceder a su superposición mediante el programa PyMOL de visualización de moléculas en 3D.



Figura 35: Superposición del sitio de unión de la Suramina a NF-Y con el factor de transcripción. En rojo se sobrealta el sitio de unión en el fármaco al que se une el factor de transcripción representado en color verde. Fuente: PyMOL.

Durante el proceso del Docking inicial, los resultados obtenidos corroboraron que este compuesto, un antipalúdico conocido como Suramina, podría ser empleado en los subsecuentes estudios *in vitro* ya que el valor PLP Fitness más alto superó el umbral propuesto de 60, siendo este de 71'8695 y el segundo de 67'6093. Debido a que estos valores son estadísticamente significativos, podemos confirmar que la Suramina es una sustancia que se une al factor de transcripción NF-Y y que, efectivamente, podía servir como modificador de la expresión de este. Este paso previo se debe realizar en toda investigación traslacional para asegurar la rentabilidad de la continuación del estudio en el laboratorio.

En cuanto al fármaco Suramina, *Nardone, V et al.* ya lo había empleado en su investigación y había confirmado su función como inhibidor de este factor de transcripción, por lo que era un gran candidato a ligando de referencia, así como control positivo de nuestro experimento. Al haber sido constatado previamente como inhibidor de NF-Y teníamos evidencias suficientes para garantizar un efecto positivo de interacción en el Docking.

Tras el análisis de los elementos *cis* encontrados en el promotor de PNPT1 se escogieron algunos de ellos como posibles candidatos a ser mutados y evaluados mediante un análisis mutacional. Los resultados recogidos en la figura 31 muestran que la actividad del promotor de PNPT1 se ve afectada de forma similar por mutaciones individuales en los motivos ISRE, CCAAT (NFY) o SP1, los cuales redujeron la actividad promotora en un 60% aproximadamente. Sin embargo, una mutación puntual en sitios similares a NRSE, redujo la actividad promotora alrededor de un 25%. En consecuencia, se piensa que la mutación de uno de estos elementos podría estar afectando a la actividad del otro, de ahí que la actividad de los mutantes con doble motivo SP1+NFY sea similar a la de los mutantes con un único motivo (SP1 o NFY).

Curiosamente, la mutación del motivo ISRE redujo aún más la actividad de los mutantes NFY hasta niveles residuales, lo que sugiere que el promotor podría estar trabajando con dos complejos transcripcionales, uno para ISRE y otro para los motivos SP1/NFY.

Hemos podido comprobar a través de un ensayo de Luciferasa que ambos factores de transcripción, una vez silenciados, muestran una reducción en su actividad, sobretodo el efecto silenciador de SP1 fue 3 veces superior al del silenciador NFYA como se puede apreciar en la figura 32. Estos resultados preliminarmente indican que los factores SP1 y NF-YA están involucrados en regular cierta actividad basal del promotor de PNPT1 en células HeLa.

Como se ha comentado con anterioridad, *Bezzecchi et al.* demostró que a pesar de que todas las subunidades de NF-Y se encuentran sobreexpresadas en el cáncer hepatocelular, sólo NF-YA tiene una implicación clínica global, la cual se asocia a una mala evolución de la enfermedad. Por este motivo, hemos enfocado nuestro proyecto en desvelar su asociación junto con el destacado factor de transcripción SP1 en el promotor de PNPT1.

Según los resultados obtenidos en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, podemos afirmar que una alta expresión de PNPasa, Sp1 o NFYA se asocian con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de hígado. Por lo tanto, aquellos pacientes que presentan niveles elevados de PNPasa tienden a tener un pronóstico desfavorable en comparación con aquellos con una expresión más baja de esta enzima. Además, se objetiva que una mayor sobreexpresión de NFYA se correlaciona con tener una esperanza de vida de un 5% menor y, por ende, una evolución y desenlace peor. Por este motivo, en el presente trabajo de final de grado, también se llevó a cabo el silenciamiento de NFYA con el fin de observar su influencia en la translocasa PNPasa y la modificación de la actividad mitocondrial.

A la luz de los resultados obtenidos en los diversos estudios y análisis, se sugiere que la actividad del complejo transcripcional SP1/NFY en el promotor de PNPT1 podría estar ampliamente implicada en el crecimiento y supervivencia de las células tumorales. Asimismo, los datos obtenidos sugieren la posible existencia de un contexto patológico en el que la actividad del promotor de PNPT1 dependa tanto de Sp1 como de NF-YA. En consecuencia, la regulación de la formación del complejo SP1/NFY podría ser la causa del aumento de la expresión del PNPT1 asociado a mal pronóstico en CHC.

Por lo tanto, el promotor de PNPT1 podría desempeñar un papel relevante en el crecimiento del tumor y la supervivencia de las células hepáticas.

Existe evidencia que respaldan la idea de que la actividad mitocondrial desempeña un papel esencial en la progresión oncogénica, y no solo se limita a ser una fuente de estrés patogénico.⁸⁸ Asimismo, se plantean la posibilidad de que sirvan como dianas para el descubrimiento de nuevos tratamientos contra el cáncer.⁸⁹

En este contexto, los ensayos que se realizaron con Resazurina para comprobar la actividad mitocondrial tras silenciar NFYA respaldan dichos estudios. Como se puede apreciar en la gráfica de las figuras 33A y 33B, construida con los valores finales del experimento, se observa una disminución significativa en el grupo celular con el factor de transcripción NF-YA silenciado.

Por otro lado, tras comprobar mediante métodos bioinformáticos que la Suramina interaccionaba con el factor de transcripción NF-Y del gen PNPT1, pasamos a cultivar HepG2, empleado como modelo celular de cáncer hepático, con el fin de procesar los ensayos de actividad mitocondrial, viabilidad y toxicidad dosis-dependiente. Se determinó que la actividad mitocondrial y viabilidad celular se veían alteradas cuando empleábamos concentraciones más allá de 100 μM de Suramina, este rango podría ser considerado como el “*intervalo terapéutico*”. Finalmente, tras varias pruebas con diversas dosis, se plantea que la concentración máxima previa a la aparición de citotoxicidad *in vitro* sería entre 80 - 100 μM , equivalente a la llamada “*concentración máxima = Cmax*”.

Al mismo tiempo, tras estudios semicuantitativos validamos que el tratamiento de los cultivos de HepG2 con Suramina manifestaban alteraciones en los niveles de PNPasa que coincidían con los niveles de actividad obtenidos en los ensayos de dosis respuesta con Resazurina. En la figura 35 se observa, por un lado, que los niveles de PNPasa son indetectables hasta los 80 μM de ambos tratamientos apreciándose unas bandas cerca de 70 kDa correspondientes a la proteína PNPasa (77kDa peso). A partir de dicha concentración los niveles vuelven a ser indetectables, lo cual asumimos que se debe a la muerte celular ocurrida especialmente a partir de 100 μM de concentración de tratamiento como tal y como se observó también en los ensayos de dosis-respuesta.

Por consiguiente, se refuerza la hipótesis planteada *in silico* acerca de la posibilidad de que dicha sustancia interactúe con el gen PNPT1 y, en concreto, con el factor de transcripción NFYA, así como se determinó en un pionero estudio de Nardone et al, sobre la inhibición de NF-Y por Suramina.⁹⁰

Dados los resultados obtenidos en nuestro experimento, un aumento de los niveles de proteína PNPasa, podemos aventurarnos a especular que las células de la línea tumoral epitelial de estudio han podido desarrollar un mecanismo de compensación fisiológico para compensar la inhibición ocasionada por la administración de Suramina.

Por último, en la fase final del estudio y con la colaboración del centro de investigación de La Fe, se procesaron las muestras seleccionadas de CHC mediante la técnica de IHQ. En la caracterización de la expresión proteica de PNPasa, se observó una expresión citoplasmática granular, concordante con un patrón mitocondrial y una mayor intensidad de tinción a nivel de las células cercanas a los límites del estroma peri-tumoral. No obstante, como se aprecia en la figura 36, las proteínas NF-YA y SP1 se localizaron mayormente a nivel nuclear, presentando también un incremento en la intensidad en estas zonas periféricas en comparación con las zonas centrales, donde habitualmente hay más necrosis. Cabe destacar que, sobretodo, la expresión de NF-YA era muy baja en la zona central, mientras que estaba aumentada significativamente en el frente de expansión tumoral.

En resumen, hemos caracterizado el promotor del gen humano PNPT1 y establecido los papeles esenciales de los factores de transcripción SP1 y NFY en la expresión de PNPT1. Nuestros resultados sugieren que los sitios de unión de SP1 y NFY funcionan como un único elemento *cis* dentro del promotor de PNPT1, y que en el CHC en el cual se sobreexpresa la proteína PNPasa, la actividad promotora del gen PNPT1 depende de SP1 y/o NFY.

En consecuencia, se plantea que la regulación de la formación del complejo NFY/SP1 podría ser el factor determinante en el aumento de la expresión de PNPT1, lo que a su vez asocia un mal pronóstico en pacientes con cáncer de hígado.

Por esta razón, ampliando estudios sobre dicho complejo y buscando nuevos compuestos que modifiquen al mismo, podría ser de gran ayuda para el descubrimiento de posibles futuras dianas terapéuticas más efectivas y de alto impacto clínicos aportando un grano de arena en la lucha contra el cáncer.

A la luz de los resultados obtenidos, se respalda la hipótesis de que la regulación de PNPT1 a través de NF-YA, SP1 y la administración de Suramina podría tener un impacto en el pronóstico de los pacientes con cáncer hepatocelular. Por ende, el aumento de los niveles de proteína PNPasa tras la administración de Suramina en una línea celular de hepatocarcinoma, así como su sobreexpresión en las zonas periféricas de muestras de pacientes con CHC, podríamos aventurarnos a decir que este factor de transcripción facilita el avance del tumor aumentando su capacidad oncogénica.

Respecto a las líneas de futuro, si bien son necesarios más estudios para poder profundizar sobre su papel multifacético en la progresión tumoral, el mantenimiento del fenotipo epitelial y sus efectos in vivo, la PNPasa podría plantearse como un marcador molecular útil que permitiría estudiar la progresión de pacientes con cáncer hepatocelular.

6. CONCLUSIONES

En conclusión, tras los ensayos y análisis llevados a cabo en el estudio experimental del presente Trabajo de Fin de Grado, se puede afirmar que se han cumplido los objetivos propuestos evidenciando lo siguiente:

Objetivo 1: Caracterización del promotor del gen PNPT1 investigando el papel de los factores de transcripción NF-YA y SP1 en la regulación de la expresión génica.

→ Hemos logrado caracterizar con éxito el promotor del gen PNPT1 y su relación con los factores de transcripción NF-YA y SP1. Nuestros hallazgos sugieren que la actividad de este complejo de transcripción en el promotor de PNPT1 está estrechamente relacionada con el crecimiento tumoral y la viabilidad de las células hepáticas en el contexto del cáncer hepatocelular. Esta caracterización es un paso crucial para entender la regulación de PNPT1 y su posible impacto en el pronóstico del cáncer hepático.

Objetivo 2: Analizar los efectos de las alteraciones en los sitios de unión putativos de los factores de transcripción NF-YA y SP1 en la viabilidad celular y actividad mitocondrial.

→ Nuestros experimentos han demostrado que las alteraciones en los sitios de unión putativos de los factores de transcripción NF-YA y SP1 tienen un impacto significativo en la viabilidad celular y la actividad mitocondrial. Esto respalda la hipótesis de que la regulación de estos factores en el promotor de PNPT1 modulan el funcionamiento de las células hepáticas en CHC.

→ Estos resultados sugieren que la modulación de NF-YA y SP1 podría ser una potencial y viable diana terapéutica.

Objetivo 3: Evaluar *in vitro* el impacto de la Suramina en la regulación de niveles de PNPasa en células de hepatocarcinoma y su posible aplicación terapéutica.

→ Nuestros experimentos *in vivo* han confirmado que la administración de Suramina provoca una disminución de los niveles de PNPasa en las células de hepatocarcinoma. Este hallazgo es prometedor y sugiere que la Suramina podría ser una opción terapéutica valiosa para el tratamiento del cáncer hepatocelular al dirigirse a la expresión de PNPT1. Además, apoya la idea de que la regulación de la formación del complejo NFY/SP1 en el promotor de PNPT1 es un factor crítico en el pronóstico del cáncer hepático.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Racanelli, V. and Rehermann, B. (2006) 'The liver as an immunological organ', *Hepatology*, 43(Supplement 1). doi:10.1002/hep.21060.
2. Giraud J, Chalopin D, Blanc JF, Saleh M. Hepatocellular Carcinoma Immune Landscape and the Potential of Immunotherapies. *Front Immunol*. 2021 Mar 18;12:655697. doi: 10.3389/fimmu.2021.655697.
3. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017 Nov 6;27(21):R1147-R1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
4. Heller M, Parikh ND, Fidelman N, Owen D. Frontiers of therapy for hepatocellular carcinoma. *Abdom Radiol (NY)*. 2021 Aug;46(8):3648-3659. doi: 10.1007/s00261-021-03065-0. Epub 2021 Apr 10.
5. Verslype C, Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Berlin JD, Cunningham D, et al. The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008. *Ann Oncol*. 2009;20 Suppl 7: vii1-vii6. Doi: 10.1093/annonc/mdp281.
6. Díaz Sánchez, A. et al. (2007) 'Factores pronósticos en pacientes con carcinoma hepatocelular desestimado para tratamiento', *Gastroenterología y Hepatología*, 30(8), pp. 441–448. doi:10.1157/13110488.
7. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2019 Jan;156(2):477-491.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.065.
8. Villanueva, A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal Of Medicine*, 380(15), 1450-1462. <https://doi.org/10.1056/nejmra1713263>.
9. Tanai M. Alcohol and hepatocarcinogenesis. *Clin Mol Hepatol*. 2020 Oct;26(4):736-741. doi: 10.3350/cmh.2020.0203.
10. Chen M, Zhong W, Xu W. Alcohol and the mechanisms of liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2023 Aug;38(8):1233-1240. doi: 10.1111/jgh.16282.
11. Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med*. 2003 Sep;3(6):573-88. doi: 10.2174/1566524033479546.
12. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016 May 27;2(5):e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200.

13. Karagozian R, Derdák Z, Baffy G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Metabolism*. 2014 May;63(5):607-17. doi: 10.1016/j.metabol.2014.01.011.
14. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015 Oct;149(5):1226-1239.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.061.
15. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Meiller C, Shinde J, Soysouvanh F, Calatayud AL, Pinyol R, Pelletier L, Balabaud C, Laurent A, Blanc JF, Mazzaferro V, Calvo F, Villanueva A, Nault JC, Bioulac-Sage P, Stratton MR, Llovet JM, Zucman-Rossi J. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015 May;47(5):505-511. doi: 10.1038/ng.3252.
16. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017 Jun 15;169(7):1327-1341.e23. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.046.
17. Renne SL, Sarcognato S, Sacchi D, Guido M, Roncalli M, Terracciano L, Di Tommaso L. Hepatocellular carcinoma: a clinical and pathological overview. *Pathologica*. 2021 Jun;113(3):203-217. doi: 10.32074/1591-951X-295.
18. Ohashi K, Pimienta M, Seki E. Alcoholic liver disease: A current molecular and clinical perspective. *Liver Res*. 2018 Dec;2(4):161-172. doi: 10.1016/j.livres.2018.11.002.
19. Desjonqueres E, Campani C, Marra F, Zucman-Rossi J, Nault JC. Preneoplastic lesions in the liver: Molecular insights and relevance for clinical practice. *Liver Int*. 2022 Mar;42(3):492-506. doi: 10.1111/liv.15152.
20. Dhanasekaran R, Bando S, Roberts LR. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Res*. 2016 May 12;5:F1000 Faculty Rev-879. doi: 10.12688/f1000research.6946.1.
21. Qin LX, Tang ZY. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol*. 2003 Mar;9(3):385-91. doi: 10.3748/wjg.v9.i3.385.

22. Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2017 Mar;34(2):153-159. doi: 10.1053/j.semdp.2016.12.011.
23. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2019 Jan;156(2):477-491.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.065.
24. Chen T, Dai X, Dai J, Ding C, Zhang Z, Lin Z, Hu J, Lu M, Wang Z, Qi Y, Zhang L, Pan R, Zhao Z, Lu L, Liao W, Lu X. AFP promotes HCC progression by suppressing the HuR-mediated Fas/FADD apoptotic pathway. *Cell Death Dis.* 2020 Oct 2;11(10):822. doi: 10.1038/s41419-020-03030-7.
25. Galle PR, Foerster F, Kudo M, Chan SL, Llovet JM, Qin S, Schelman WR, Chintharlapalli S, Abada PB, Sherman M, Zhu AX. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2019 Dec;39(12):2214-2229. doi: 10.1111/liv.14223.
26. Wong RJ, Ahmed A, Gish RG. Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis - hepatocellular carcinoma and other disorders. *Clin Liver Dis.* 2015 May;19(2):309-23. doi: 10.1016/j.cld.2015.01.005.
27. Piñero F, Dirchwolf M, Pessôa MG. Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells.* 2020 Jun 1;9(6):1370. doi: 10.3390/cells9061370.
28. Reig M, Forner A, Ávila MA, Ayuso C, Mínguez B, Varela M, Bilbao I, Bilbao JI, Burrel M, Bustamante J, Ferrer J, Gómez MÁ, Llovet JM, De la Mata M, Matilla A, Pardo F, Pastrana MA, Rodríguez-Perálvarez M, Tabernero J, Urbano J, Vera R, Sangro B, Bruix J. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH. *Med Clin (Barc).* 2021 May 7;156(9): 463.e1-463.e30. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2020.09.022.
29. El Dika I, Makki I, Abou-Alfa GK. Hepatocellular carcinoma, novel therapies on the horizon. *Chin Clin Oncol.* 2021 Feb;10(1):12. doi: 10.21037/cco-20-113.
30. Lim H, Ramjeesingh R, Liu D, Tam VC, Knox JJ, Card PB, Meyers BM. Optimizing Survival and the Changing Landscape of Targeted Therapy for Intermediate and

- Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *J Natl Cancer Inst.* 2021 Feb 1;113(2):123-136. doi: 10.1093/jnci/djaa119.
31. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 Jan 21;7(1):6. doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
32. Leowattana W, Leowattana T, Leowattana P. Systemic treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2023 Mar 14;29(10):1551-1568. doi: 10.3748/wjg.v29.i10.1551.
33. Han Y, Zhi WH, Xu F, Zhang CB, Huang XQ, Luo JF. Selection of first-line systemic therapies for advanced hepatocellular carcinoma: A network meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol.* 2021 May 21;27(19):2415-2433. doi: 10.3748/wjg.v27.i19.2415.
34. Sonbol MB, Riaz IB, Naqvi SAA, Almquist DR, Mina S, Almasri J, Shah S, Almader-Douglas D, Uson Junior PLS, Mahipal A, Ma WW, Jin Z, Mody K, Starr J, Borad MJ, Ahn DH, Murad MH, Bekaii-Saab T. Systemic Therapy and Sequencing Options in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2020 Dec 1;6(12):e204930. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.4930.
35. Su TH, Hsu SJ, Kao JH. Paradigm shift in the treatment options of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2022 Aug;42(9):2067-2079. doi: 10.1111/liv.15052.
36. Eugen K. Current treatment options for hepatocellular carcinoma. *Klin Onkol.* 2020 Fall;33(Supplementum 3):20-25. English. doi: 10.14735/amko20203S20.
37. Giraud J, Chalopin D, Blanc JF, Saleh M. Hepatocellular Carcinoma Immune Landscape and the Potential of Immunotherapies. *Front Immunol.* 2021 Mar 18;12:655697. doi: 10.3389/fimmu.2021.655697.
38. Caicedo A, Zambrano K, Sanon S, Luis Vélez J, Montalvo M, Jara F, Moscoso SA, Vélez P, Maldonado A, Velarde G. The diversity and coexistence of extracellular mitochondria in circulation: A friend or foe of the immune system. *Mitochondrion.* 2021 May;58:270-284. doi: 10.1016/j.mito.2021.02.014.
39. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014 Jan 16;505(7483):335-43. doi: 10.1038/nature12985.

40. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 2019 Jul 5;8(7):680. doi: 10.3390/cells8070680. PMID: 31284394; PMCID: PMC6678092.
41. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1145-59. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
42. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.
43. Salazar C, Ruiz-Hincapie P, Ruiz LM. The Interplay among PINK1/PARKIN/Dj-1 Network during Mitochondrial Quality Control in Cancer Biology: Protein Interaction Analysis. *Cells*. 2018 Sep 29;7(10):154. doi: 10.3390/cells7100154.
44. Chen HW, Rainey RN, Balatoni CE, Dawson DW, Troke JJ, Wasiak S, Hong JS, McBride HM, Koehler CM, Teitell MA, French SW. Mammalian polynucleotide phosphorylase is an intermembrane space RNase that maintains mitochondrial homeostasis. *Mol Cell Biol*. 2006 Nov; 26 (22): 8475-87. doi: 10.1128/MCB.01002-06.
45. Wang, G.; Chen, H.W.; Oktay, Y.; Zhang, J.; Allen, E.L.; Smith, G.M.; Fan, K.C.; Hong, J.S.; French, S.W.; McCaffery, J.M.; et al. PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell* 2010, 142, 456–467. doi:10.1016/j.cell.2010.06.035.
46. Vedrenne V, Gowher A, De Lonlay P, Nitschke P, Serre V, Boddaert N, Altuzarra C, Mager-Heckel AM, Chretien F, Entelis N, Munnich A, Tarassov I, Rötig A. Mutation in PNPT1, which encodes a polyribonucleotide nucleotidyltransferase, impairs RNA import into mitochondria and causes respiratory-chain deficiency. *Am J Hum Genet*. 2012 Nov 2;91(5):912-8. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.09.001.
47. Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y, Kasugai Y, Karnan S, Kameoka J, Sasaki T, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2006 Jun;97(6):499-504. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00209.x.
48. Luczynski W, Kowalczyk O, Stasiak-Barmuta A, Ilendo E, Krawczyk-Rybak M, Chyczewski L. Acute lymphoblastic leukemia-derived dendritic cells express tumor associated antigens: PNPT1, PMPCB, RHAMM, BSG and ERCC1. *Neoplasma*. 2009;56(5):428-34. doi: 10.4149/neo_2009_05_428.

49. Jin L, Wang Y, Li S, Chen D, Zhao X. Novel PNPT1-ALK fusion variant exerted significant benefit to crizotinib in NSCLC. *Lung Cancer*. 2020 Aug;146:382-384. doi: 10.1016/j.lungcan.2020.05.014.
50. Hu QG, Yang Z, Chen JW, Kazobinka G, Tian L, Li WC. MiR-183-5p-PNPT1 Axis Enhances Cisplatin-induced Apoptosis in Bladder Cancer Cells. *Curr Med Sci*. 2022 Aug;42(4):785-796. doi: 10.1007/s11596-022-2580-x.
51. Bamborschke D, Kreutzer M, Koy A, Koerber F, Lucas N, Huenseler C, Herkenrath P, Lee-Kirsch MA, Cirak S. PNPT1 mutations may cause Aicardi-Goutières-Syndrome. *Brain Dev*. 2021 Feb;43(2):320-324. doi: 10.1016/j.braindev.2020.10.005.
52. Shimada E, Ahsan FM, Nili M, Huang D, Atamdede S, TeSlaa T, Case D, Yu X, Gregory BD, Perrin BJ, Koehler CM, Teitell MA. PNPase knockout results in mtDNA loss and an altered metabolic gene expression program. *PLoS One*. 2018 Jul 19;13(7):e0200925. doi: 10.1371/journal.pone.0200925.
53. Matilainen S, Carroll CJ, Richter U, Euro L, Pohjanpelto M, Paetau A, Isohanni P, Suomalainen A. Defective mitochondrial RNA processing due to PNPT1 variants causes Leigh syndrome. *Hum Mol Genet*. 2017 Sep 1;26(17):3352-3361. doi: 10.1093/hmg/ddx221.
54. Von Ameln S, Wang G, Boulouiz R, Rutherford MA, Smith GM, Li Y, Pogoda HM, Nürnberg G, Stiller B, Volk AE, Borck G, Hong JS, Goodyear RJ, Abidi O, Nürnberg P, Hofmann K, Richardson GP, Hammerschmidt M, Moser T, Wollnik B, Koehler CM, Teitell MA, Barakat A, Kubisch C. A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. *Am J Hum Genet*. 2012 Nov 2;91(5):919-27. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.09.002.
55. Sato R, Arai-Ichinoi N, Kikuchi A, Matsushashi T, Numata-Uematsu Y, Uematsu M, Fujii Y, Murayama K, Ohtake A, Abe T, Kure S. Novel biallelic mutations in the PNPT1 gene encoding a mitochondrial-RNA-import protein PNPase cause delayed myelination. *Clin Genet*. 2018 Feb;93(2):242-247. doi: 10.1111/cge.13068.
56. Yu YL, Chou RH, Wu CH, Wang YN, Chang WJ, Tseng YJ, Chang WC, Lai CC, Lee HJ, Huo L, Chen CH, Hung MC. Nuclear EGFR suppresses ribonuclease activity of polynucleotide phosphorylase through DNAPK-mediated phosphorylation at

- serine 776. *J Biol Chem.* 2012 Sep 7;287(37):31015-26. doi: 10.1074/jbc.M112.358077.
57. Slavotinek AM, Garcia ST, Chandratillake G, Bardakjian T, Ullah E, Wu D, Umeda K, Lao R, Tang PL, Wan E, Madireddy L, Lyalina S, Mendelsohn BA, Dugan S, Tirch J, Tischler R, Harris J, Clark MJ, Chervitz S, Patwardhan A, West JM, Ursell P, de Alba Campomanes A, Schneider A, Kwok PY, Baranzini S, Chen RO. Exome sequencing in 32 patients with anophthalmia/micropthalmia and developmental eye defects. *Clin Genet.* 2015 Nov;88(5):468-73. doi: 10.1111/cge.12543.
58. Ventura I, Revert F, Revert-Ros F, Gómez-Tatay L, Prieto-Ruiz JA, Hernández-Andreu JM. SP1 and NFY Regulate the Expression of PNPT1, a Gene Encoding a Mitochondrial Protein Involved in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 27;23(19):11399. doi: 10.3390/ijms231911399.
59. Khaw SL, Min-Wen C, Koh CG, Lim B, Shyh-Chang N. Oocyte Factors Suppress Mitochondrial Polynucleotide Phosphorylase to Remodel the Metabolome and Enhance Reprogramming. *Cell Rep.* 2015 Aug 18;12(7):1080-8. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.032.
60. Wang G, Chen HW, Oktay Y, Zhang J, Allen EL, Smith GM, Fan KC, Hong JS, French SW, McCaffery JM, Lightowers RN, Morse HC 3rd, Koehler CM, Teitell MA. PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell.* 2010 Aug 6;142(3):456-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.035.
61. Bezzecchi E, Ronzio M, Mantovani R, Dolfini D. NF-Y Overexpression in Liver Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 1;21(23):9157. doi: 10.3390/ijms21239157.
62. Sachini N, Papamatheakis J. NF-Y and the immune response: Dissecting the complex regulation of MHC genes. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2017 May;1860(5):537-542. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.10.013.
63. Dolfini D, Zambelli F, Pedrazzoli M, Mantovani R, Pavesi G. A high definition look at the NF-Y regulome reveals genome-wide associations with selected transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jun 2;44(10):4684-702. doi: 10.1093/nar/gkw096.
64. Romier C, Cocchiarella F, Mantovani R, Moras D. The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem.* 2003 Jan 10;278(2):1336-45. doi: 10.1074/jbc.M209635200.

65. Dolfini D, Gatta R, Mantovani R. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012 Jan-Feb;47(1):29-49. doi: 10.3109/10409238.2011.628970.
66. Ly LL, Yoshida H, Yamaguchi M. Nuclear transcription factor Y and its roles in cellular processes related to human disease. *Am J Cancer Res.* 2013 Aug 14;3(4):339-46. PMID: 23977444; PMCID: PMC3744014.
67. Bezzecchi E, Ronzio M, Mantovani R, Dolfini D. NF-Y Overexpression in Liver Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 1;21(23):9157. doi: 10.3390/ijms21239157. PMID: 33271832; PMCID: PMC7731131.
68. Vellingiri B, Iyer M, Devi Subramaniam M, Jayaramayya K, Siama Z, Giridharan B, Narayanasamy A, Abdal Dayem A, Cho SG. Understanding the Role of the Transcription Factor Sp1 in Ovarian Cancer: from Theory to Practice. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 9;21(3):1153. doi: 10.3390/ijms21031153. PMID: 32050495; PMCID: PMC7038193.
69. Nagaoka M, Shiraishi Y, Sugiura Y. Selected base sequence outside the target binding site of zinc finger protein Sp1. *Nucleic Acids Res.* 2001 Dec 15;29(24):4920-9. doi: 10.1093/nar/29.24.4920. PMID: 11812820; PMCID: PMC97581.
70. Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J.* 2015 Jan;282(2):224-58. doi: 10.1111/febs.13148. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25393971.
71. Vizcaíno C, Mansilla S, Portugal J. Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther.* 2015 Aug;152:111-24. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.008. Epub 2015 May 8. PMID: 25960131.
72. Chatterjee B, Ghosh K, Suresh L, Kanade SR. Curcumin ameliorates PRMT5-MEP50 arginine methyltransferase expression by decreasing the Sp1 and NF-YA transcription factors in the A549 and MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem.* 2019 May;455(1-2):73-90. doi: 10.1007/s11010-018-3471-0. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30392062.
73. Safe S. Specificity Proteins (Sp) and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 8;24(6):5164. doi: 10.3390/ijms24065164. PMID: 36982239; PMCID: PMC10048989.
74. Safe S, Imanirad P, Sreevalsan S, Nair V, Jutooru I. Transcription factor Sp1, also known as specificity protein 1 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2014

- Jul;18(7):759-69. doi: 10.1517/14728222.2014.914173. Epub 2014 May 3. PMID: 24793594.
75. Wiedemar N, Hauser DA, Mäser P. 100 Years of Suramin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Feb 21;64(3):e01168-19. doi: 10.1128/AAC.01168-19. PMID: 31844000; PMCID: PMC7038244.
76. Manouchehri JM, Marcho L, Cherian MA. The role of heparan sulfate in enhancing the chemotherapeutic response in triple-negative breast cancer. *bioRxiv [Preprint].* 2023 Sep 12:2023.09.08.556819. doi: 10.1101/2023.09.08.556819. PMID: 37745355; PMCID: PMC10515779.
77. Kaur R, Deb PK, Diwan V, Saini B. Heparanase Inhibitors in Cancer Progression: Recent Advances. *Curr Pharm Des.* 2021;27(1):43-68. doi: 10.2174/1381612826666201113105250. PMID: 33185156.
78. Tayel, A., Ebrahim, M. A., Ibrahim, A. S., El-Gayar, A. M., & Al-Gayyar, M. M. (2014). Cytotoxic effects of suramin against HepG2 cells through activation of intrinsic apoptotic pathway. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 19(4), 1048–1054.
79. Carrera Páez, L. C., Pirajan Quintero, I. D., Urrea Suarez, M. C., Sanchez Mora, R. M., Gómez Jiménez, M., y Monroy Cano, L. A. (2015). Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA*, 13(23). <https://doi.org/10.22490/24629448.1371>.
80. Guo L, Dial S, Shi L, Branham W, Liu J, Fang JL, Green B, Deng H, Kaput J, Ning B. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2011 Mar;39(3):528-38. doi: 10.1124/dmd.110.035873. Epub 2010 Dec 13. PMID: 21149542; PMCID: PMC3061558.
81. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol.* 2015;1250:77-93. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_5. PMID: 26272135.
82. Wilkening S, Bader A. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(4):207-13. doi: 10.1002/jbt.10085. PMID: 12898644.

83. Testa A, Donati G, Yan P, Romani F, Huang TH, Viganò MA, Mantovani R. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip experiments uncover a widespread distribution of NF-Y binding CCAAT sites outside of core promoters. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13606-15. doi: 10.1074/jbc.M414039200. Epub 2005 Jan 11. PMID: 15647281.
84. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Woolsey J. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D668-72. doi: 10.1093/nar/gkj067. PMID: 16381955; PMCID: PMC1347430.
85. Ventura I, Sanchiz L, Legidos-García ME, Murillo-Llorente MT, Pérez-Bermejo M. Atezolizumab and Bevacizumab Combination Therapy in the Treatment of Advanced Hepatocellular Cancer. *Cancers (Basel).* 2023 Dec 30;16(1):197. doi: 10.3390/cancers16010197. PMID: 38201624; PMCID: PMC10777975.
86. Li Z, You C, Huang J, Zhang M. NFYA_{v1} is a Tumor-Promoting Transcript Associated with Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Med Sci Monit.* 2023 Jan 21;29:e938410. doi: 10.12659/MSM.938410. PMID: 36680333; PMCID: PMC9875548.
87. Brown ZJ, Tsilimigras DI, Ruff SM, Mohseni A, Kamel IR, Cloyd JM, Pawlik TM. Management of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *JAMA Surg.* 2023 Apr 1;158(4):410-420. doi: 10.1001/jamasurg.2022.7989. PMID: 36790767.
88. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell.* 2016 Mar 3;61(5):667-676. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.011. PMID: 26942671; PMCID: PMC4779192.
89. Missiroli S, Perrone M, Genovese I, Pinton P, Giorgi C. Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. *EBioMedicine.* 2020 Sep;59:102943. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102943. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32818805; PMCID: PMC7452656.
90. Nardone V, Chaves-Sanjuan A, Lapi M, Airoidi C, Saponaro A, Pasqualato S, Dolfini D, Camilloni C, Bernardini A, Gnesutta N, Mantovani R, Nardini M. Structural Basis of Inhibition of the Pioneer Transcription Factor NF-Y by Suramin. *Cells.* 2020 Oct 29;9(11):2370. doi: 10.3390/cells9112370. PMID: 33138093; PMCID: PMC7692634.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Listado de las secuencias mutacionales introducidas en el promotor del gen PNPT1.

Gene Name: **cons1_WT**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

```
AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGGAAACGAAACTC
CATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCGGAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGC
GTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
```

Gene Name: **cons2_mutISRE**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

```
AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGCAACTAGAACTC
CATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCGGAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGC
GTTGACCGCGTGCCGGGTGTC
```

Gene Name: **cons3_mutSP1**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

```
AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
```

TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGGAAACGAAACTC
CATCAGGCTCCG**AA**CCACGGTCTGCGGAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGC
GTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

Gene Name: **cons4_mutNRSE**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGGAAACGAAACTC
CATCAGGCTCCGCCCA**AAA**TCTGCGGAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGC
GTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

Gene Name: **cons5_mutNRSE+Sp1**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGGAAACGAAACTC
CATCAGGCTCCG**AA**CCA**AAA**TCTGCGGAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCTGC
GTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

Gene Name: **cons6_mutCCAATbox**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT

TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGGAAACGAAACTC
CATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCGGAGTGAGCCAA**A**CAGGGCACAGCCTGC
GTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

Gene Name: **cons7_mutCCAATbox + Sp1**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGGAAACGAAACTC
CATCAGGCTCCG**AA**CCACGGTCTGCGGAGTGAGCCAA**A**CAGGGCACAGCCTG
CGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

Gene Name: **cons8_mutISRE+CCAATbox**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCG**CAA****CTAG**AACTC
CATCAGGCTCCGCCCCACGGTCTGCGGAGTGAGCCAA**A**CAGGGCACAGCCTGC
GTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

Gene Name: **cons9_mutISRE+SP1+ CCAATbox**, Length: 408bp, Vector Name: pUC57

Sequence:

AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT

GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGCAACTAGAACTC
CATCAGGCTCCGAAACCACGGTCTGCGGAGTGAGCCAAACAGGGCACAGCCTG
CGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

Gene Name: **cons10_mutISRE + SP1 + NRSE + CCAATbox**, Length: 408bp, Vector:
pUC57

Sequence:

AGGCCACCACCCAAATTCTAATTCTTAGTTCACAGATCCAAATAATAATAAT
GTGTTGTTCTATGACTTCTAGTATTTAAAAGTAAATATAAAATTTACTCTGCATAT
TAAACATTTACATTATTCTAGGACTTCTCCTTTAAATTACGATAGTACACACAC
AAAAACCTTATTTATCTAATTGCCTTTCGTTGGCACATAAAGACAAAGATCGTT
TGCAACATAATCGCGTTCTGATAGGTTTGACCCTCTCTAGTCTTCGTAGAAGGT
GGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGCAACTAGAACTC
CATCAGGCTCCGAACCAAACTCTGCGGAGTGAGCCAAACAGGGCACAGCCTG
CGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

WT con todos los elementos destacados en amarillo

GTGGCCAAGGTTTCCGTTACCCCGGCGTCCCTCGGGCACCGCGGAAACGA AAC
TCCATCAGGCTCCGCCCA CGG TCTGCGGAGTGAGCCAATCAGGGCACAGCCT
GCGTTGACCGCGTGCCGGGTGTC

SP1 motif: 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (GC box element).

8.2. Anexo 2: Protocolo del Vector pUC57-T

GenScript Quick T-A Cloning Kit



Technical Manual No. 0224

Version 20061030

I	Description.....	1
II	Kit Components.....	1
III	Vector Description.....	1
IV	Storage.....	2
V	Quality Control.....	2
VI	TA Cloning Procedure.....	2
VII	Trouble Shooting.....	5
VIII	Order Information.....	5

I. DESCRIPTION

Quick T-A Cloning Kit is designed for convenient cloning for PCR products with 3'-A overhang. Linear blunt plasmid was added one thymine base at its 3'-end following *EcoRV* digestion. It includes special quick ligation buffer. Reaction can be incubated for 30 minutes at 16°C. *LacZ* report gene in the vector allows the blue-white screening based the principle of α -complement. Any sequencing primers used for the pUC57 are suitable for the sequencing of the pUC57-T vector.

II. KIT COMPONENTS

The kit (SD0228) contains the following components:

pUC57-T Vector (50 ng/ μ l)	20 μ l
Control Insert (50 ng/ μ l)	10 μ l
2 \times Quick Ligation Buffer	200 μ l
T4 DNA Ligase (5 Weiss units/ μ l)	20 μ l
X-Gal/ IPTG premix	1,000 μ l

III. VECTOR DESCRIPTION

pUC57-T vector is designed for convenient cloning for PCR products with 3'-A overhang. Linear blunt plasmid was added one thymine base at its 3'-end following *EcoRV* digestion. Fig. 1 is the map and restriction sites of pUC57-T Vector.

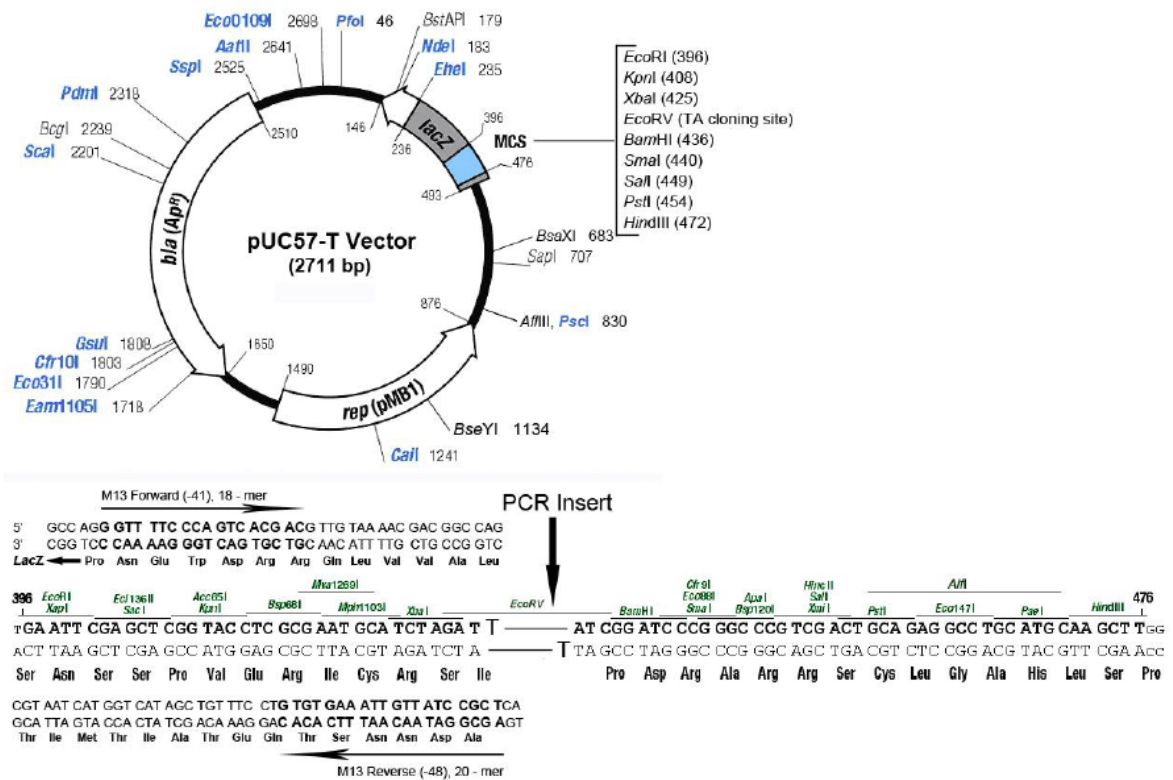


Fig. 1 Map of pUC57-T Vector

Sequencing Primers:

Forward primer: M13 Forward (-41), [DA0004](#)

Reverse primer: M13 Reverse (-48), [DA0006](#)

IV. STORAGE

Store at -20°C.

V. QUALITY CONTROL

Each lot of pUC57-T Vector is tested with PCR Cloning and Screening. Results showed that the recombinant efficiency of the white colonies is above 85%.

VI. TA CLONING PROCEDURE

A. Ligation

1. Set up your ligation system as the following

pUC57-T Vector (50 ng/µl)	1 µl
Control Insert* (50 ng/µl)	1 µl
ddH ₂ O	up to 5 µl

2. Add 5 µl of 2×Quick Ligation Buffer and mix.



3. Add 1 μ l of T4 DNA Ligase and mix thoroughly.
4. Centrifuge briefly and incubate at 16°C for 30 minutes.
5. Chill on ice (Do not heat inactivate).

* Control insert is a size of 500 bp PCR fragment amplified by *Taq* DNA polymerase. The optimal mol ratio of insert and vector is 3:1 to 6:1.

B. Transformation

1. Briefly centrifuge the ligation reaction.
2. Add 2 μ l of the ligation reaction to 50 μ l competent cell.
3. Incubate on the ice for 30 minutes.
4. Heat-shock at 42°C for 2 minutes.
5. Chill on ice for 3 minutes.
6. Add 1 ml of LB to the tube, and then shake it at 200 rpm for 1 hour.
7. Plate 50 μ l of X-Gal/ IPTG Premix on the LB/Amp plates, dry it before use.
8. Plate an appropriate amount of cells on the plates.
9. Incubate the plates at 37°C and grow overnight.

C. PCR Screening

Pick white colonies to do PCR Screening with M13 Forward (-41) (DA0004) and M13 Reverse (-48) (DA0006). The following picture (Fig. 2) is our screening result when control insert of 500 bp is cloned into pUC57-T vector.

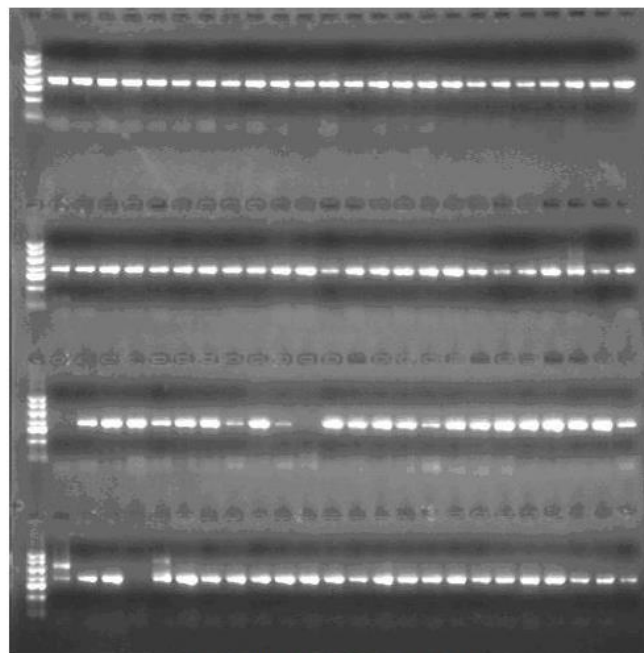


Fig. 2 PCR Screening Result



D. Sequencing

Sequencing the positive colonies with the following primers:

Forward primer [DA0004: M13 Forward \(-41\)](#) (GGTTTCCCAGTCACGAC)
Reverse primer [DA0006: M13 Reverse \(-48\)](#) (AGCGGATAACAATTTACACAC)

Fig. 3 and Fig.4 show the additional T base at 5'-end and 3'-end sequence of insert.

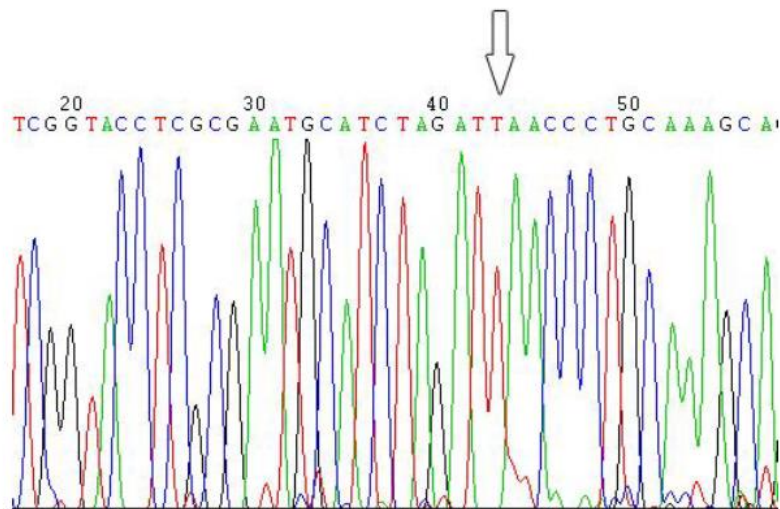


Fig. 3 5'-end sequencing result of the cloned PCR product

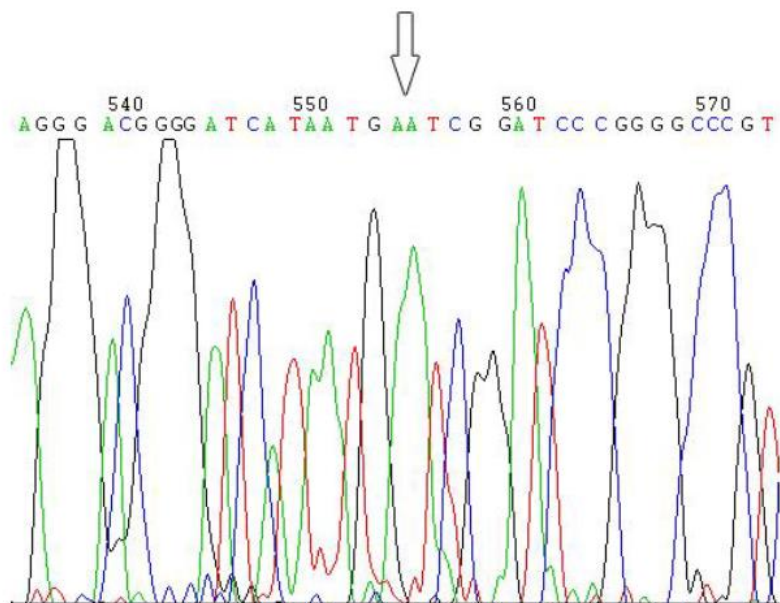


Fig. 4 3'-end sequencing result of the cloned PCR product

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE SURAMINA SOBRE EL GEN PNPT1 EN CARCINOMA HEPATOCELULAR

Autora: Carla Bretones Ribera

Director: Dr. Ignacio Ventura González

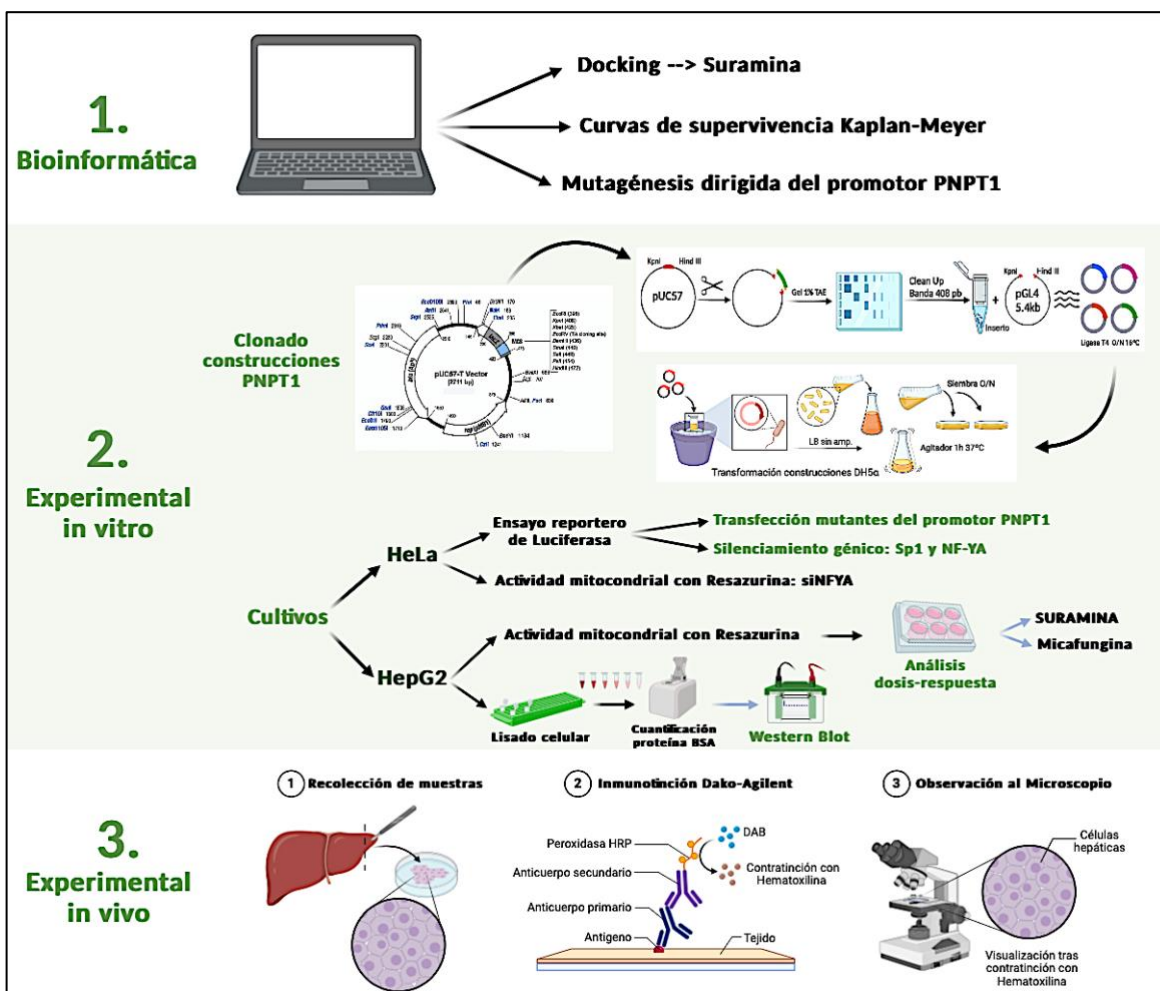
RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) es una neoplasia primaria del hígado cuya prevalencia y mortalidad es elevada a nivel mundial. Los factores de transcripción SP1 y NF-Y son conocidos por regular la actividad del promotor del gen PNPT1, cuyos niveles elevados se han asociado a una reducción en la esperanza de vida de los pacientes con CHC. PNPT1 codifica para la PNPasa, una translocasa mitocondrial implicada en el transporte de ARN.

En este estudio, empleamos la línea celular de hepatoma humano HepG2 para investigar los efectos del fármaco antipalúdico Suramina sobre la expresión de PNPT1 y la actividad mitocondrial. Nuestros objetivos incluyeron caracterizar este gen y evaluar la eficacia de la Suramina como posible tratamiento del CHC.

Utilizando técnicas de Docking, identificamos compuestos que interactúan con los factores de transcripción del gen PNPT1. Luego, mediante análisis de Kaplan-Meier obtuvimos las curvas de supervivencia y diseñamos construcciones de mutaciones dirigidas en la secuencia promotora, para explorar la relación entre NF-YA, SP1 y PNPT1. Existía una correlación entre los niveles de estos factores de transcripción y la expresión de PNPT1, respaldada por ensayos de luciferasa y silenciamiento génico con siARN. Los estudios *in vitro* en HepG2 revelaron una interacción positiva entre la Suramina y el promotor del gen PNPT1, así como una reducción en la actividad mitocondrial al silenciar NF-YA. Además, la administración de Suramina resultó en un aumento en los niveles de PNPasa, confirmado por ensayos de Western Blot. El análisis inmunohistoquímico de muestras de pacientes con CHC sugirió una asociación entre la sobreexpresión de NF-YA y SP, la actividad mitocondrial y los niveles de PNPasa en el tejido tumoral.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la Suramina podría modular la sobreexpresión de NF-YA y, por ende, influir en la actividad mitocondrial de las células tumorales hepáticas. Esto ofrece una posible vía para el tratamiento del CHC mediante el reposicionamiento de la Suramina, un antiguo antipalúdico.



HIPÓTESIS:

La regulación del gen PNPT1 a través de la modulación de los factores de transcripción NF-YA y SP1 tendrá un impacto significativo en la viabilidad celular y la actividad mitocondrial en las células de hepatocarcinoma. Además, la administración de Suramina resultaría en una disminución de los niveles de PNPasa suponiendo efectos beneficiosos en el futuro tratamiento del cáncer hepatocelular, contribuyendo al desarrollo de terapias efectivas y de alto impacto clínico.

Objetivo 1: Caracterización del promotor del gen PNPT1 investigando el papel de los factores de transcripción NF-YA y SP1 en la regulación de la expresión génica.

Objetivo 2: Analizar los efectos de las alteraciones en sitios de unión putativos de los factores de transcripción NF-YA y SP1 en la viabilidad celular y actividad mitocondrial.

Objetivo 3: Evaluar *in vitro* el impacto de la Suramina en la regulación de niveles de PNPasa en células de hepatocarcinoma y su posible aplicación terapéutica.

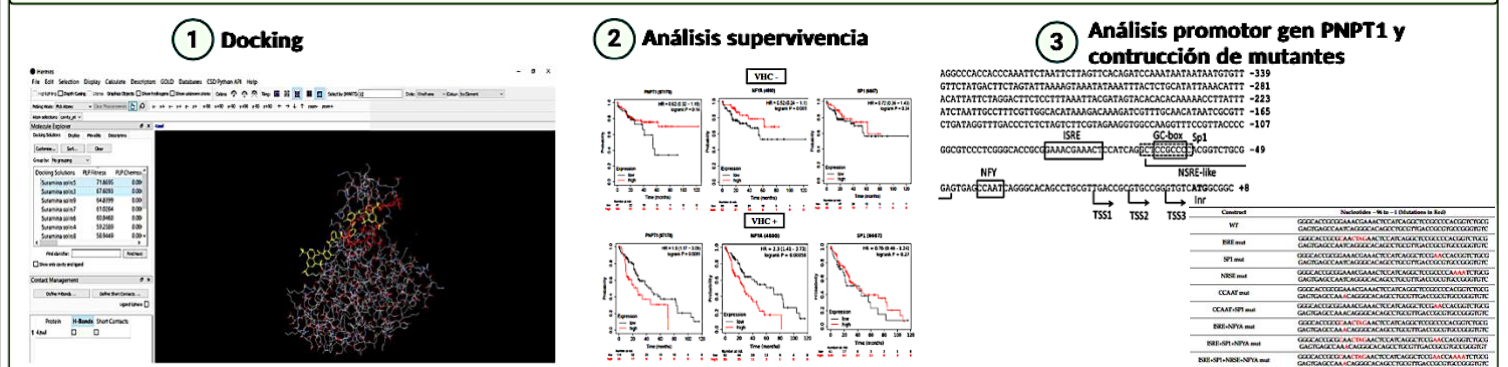
CONCLUSIONES

→ Caracterización del promotor del gen PNPT1: Nuestros hallazgos sugieren que la actividad del complejo de transcripción NF-YA/SP1 en el promotor del gen está estrechamente relacionada con el crecimiento tumoral y la viabilidad de las células hepáticas en el contexto del cáncer hepatocelular.

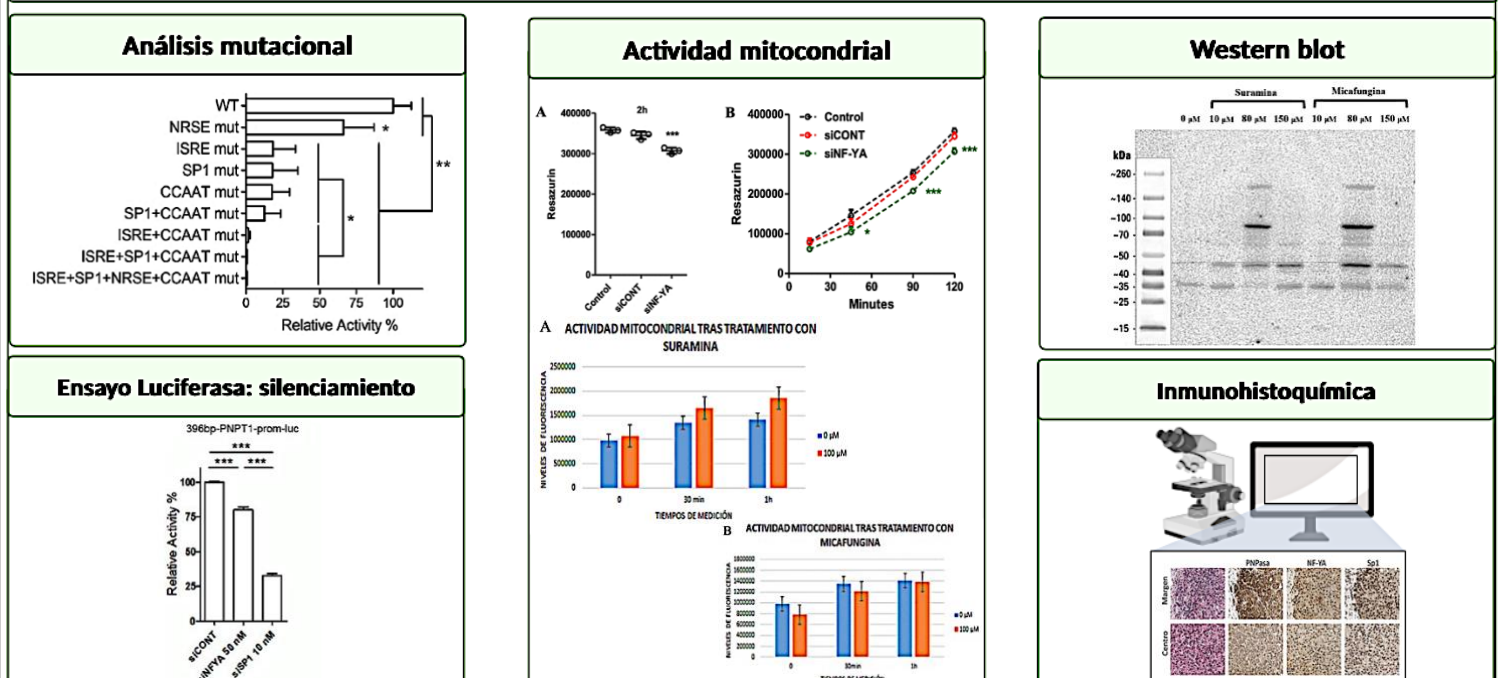
→ Nuestros experimentos han demostrado que las alteraciones en los sitios de unión putativos de los factores de transcripción NF-YA y SP1 tienen un impacto significativo en la viabilidad celular y la actividad mitocondrial. Estos resultados sugieren que la modulación de NF-YA y SP1 podría ser una potencial y viable diana terapéutica.

→ La administración de Suramina provoca una disminución de los niveles de PNPasa en las células de CHC. Este hallazgo es prometedor y sugiere que este fármaco podría ser una valiosa opción terapéutica para el tratamiento del carcinoma hepatocelular al dirigirse a la expresión de PNPT1. Además, apoya la idea de que la regulación de la formación del complejo NF-Y/SP1 en el promotor de PNPT1 es un factor crítico en el pronóstico del cáncer hepático.

RESULTADOS BIOINFORMÁTICA



RESULTADOS EXPERIMENTALES



BIBLIOGRAFÍA

- Li Z et al., 2023. NFYA v1 is a Tumor-Promoting Transcript Associated with Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. doi: 10.12659/MSM.938410.
- Bezzecchi E et al., 2020. NF-Y Overexpression in Liver Hepatocellular Carcinoma (HCC). doi: 10.3390/ijms21239157.
- Donato MT et al., 2015. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_5. PMID: 26272135.
- Nardone V et al., 2020. Structural Basis of Inhibition of the Pioneer Transcription Factor NF-Y by Suramin. doi: 10.3390/cells9112370.