



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



*Universitat Politècnica de València
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural*

*Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología
Curso 2017-2018*

Valoración de la actividad enzimática de Nicotinamida N-Metiltransferasa en líneas celulares de carcinoma pulmonar de células no pequeñas

Autor del proyecto:
Jorge Císcar Soriano

Tutor académico:
Eloisa Jantus-Lewintre

Tutor entidad colaboradora:
Agustín Gerardo Lahoz Rodríguez

València, julio del 2018

TÍTULO

Valoración de la actividad enzimática de Nicotinamida N-Metiltransferasa en líneas celulares de carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

Valoració de l'activitat enzimàtica de Nicotinamida N-Metiltransferasa en línies cel·lulars de carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites.

Assesment of enzymatic activity of Nicotinamide N-Methyltransferase in Non-small cell lung carcinoma cell lines.

RESUMEN

El cáncer de pulmón es la neoplasia con mayor mortalidad en el mundo occidental. Es altamente resistente a la terapia convencional, metastático y con una supervivencia a los 5 años del 15% para el subtipo histológico más prevalente, el carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM o NSCLC). La caracterización de mutaciones activadoras que afectan a oncogenes ha permitido definir pequeños subgrupos de pacientes que responden a los tratamientos dirigidos contra ellas, como son los inhibidores tirosina quinasa (ITQs) de EGFR. Sin embargo, un 30% de los pacientes no responden al tratamiento. Además, en el 70% de los casos en los que hay respuesta terapéutica, inevitablemente aparece progresión debido al desarrollo de resistencias mediadas por una gran variedad de mecanismos. Entre ellos la activación de mecanismos epigenéticos que median cambios histológicos, como la transición epitelio-mesenquimal (EMT). En modelos experimentales *in vitro* de CPNM que reproducen la adquisición de la resistencia a los ITQs, hemos identificado la sobreexpresión del enzima Nicotinamida N-Metiltransferasa (NNMT) como uno de los responsables de la reprogramación metabólica y epigenética que dirige el fenotipo EMT y ITQ-resistente. Por tanto, la NNMT se posiciona como una potencial diana terapéutica. En el presente proyecto se ha puesto a punto un método analítico, mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas, para medir de modo cuantitativo la actividad enzimática de dicha proteína. De esta manera, hemos podido comparar su actividad en distintos pares de líneas de carcinoma pulmonar sensibles y resistentes a ITQs. Además, este método nos ha permitido evaluar dos inhibidores para la NNMT, como son el 1-metilquinolinio y el 5-metilquinolinio. Los resultados obtenidos muestran la efectividad de estos compuestos para inhibir la actividad de la NNMT, convirtiéndose en potenciales fármacos para terapias dirigidas contra este tipo de cáncer. El método desarrollado permitiría el cribado de un número elevado de compuestos en fase preclínica.

El càncer de pulmó és la neoplàsia amb major mortalitat en el món occidental. És altament resistent a la teràpia convencional, metastàtic i amb una supervivència al cap de 5 anys del 15% pel subtipus histològic més prevalent, el carcinoma pulmonar no microcític (CPNM o NSCLC). La caracterització de mutacions activadores que afecten oncogens ha permès definir xicotets subgrups de pacients que responen als tractaments dirigits contra elles, com són els inhibidors tirosina quinasa (ITQs) d'EGFR. No obstant això, un 30% dels pacients no responen al tractament. A més, en el 70% dels casos en els quals n'hi ha resposta terapèutica, inevitablement apareix progressió a causa del desenvolupament de resistències intervingudes per una gran varietat de mecanismes. Entre ells, l'activació de mecanismes epigenètics que intervien canvis histològics, com ara la transició epiteli-mesènquima (EMT). En models experimentals *in vitro* de CPNM que reproduïxen l'adquisició de resistència als ITQs, hem identificat la sobreexpressió de l'enzim Nicotinamida N-Metiltransferasa (NNMT) com un dels responsables de la reprogramació metabòlica i epigenètica que dirigeix el fenotipus EMT i ITQ-resistent. Per tant, la NNMT es posiciona com una potencial diana terapèutica. En el present projecte s'ha posat a punt un mètode analític, mitjançant cromatografia líquida i espectrometria de masses, per mesurar de forma quantitativa l'activitat enzimàtica d'aquesta proteïna. D'aquesta manera, hem pogut comparar la seua activitat en diferents parells de línies de carcinoma pulmonar sensibles i resistents a ITQs. A més, aquest mètode ens ha permès avaluar dos inhibidors per la NNMT, com són l'1-metilquinolinio i el 5-metilquinolinio. Els resultats obtinguts mostren l'efectivitat d'aquests compostos per inhibir l'activitat de la NNMT, convertint-se en potencials fàrmacs per teràpies dirigides contra aquest tipus de càncer. El mètode desenvolupat permetria el garbellat d'un elevat nombre de compostos en fase preclínica.

Lung cancer is the neoplasm with the highest mortality in the occidental world. It is highly resistant to the conventional therapy, metastatic and with a survival after 5 years of 15% for the histological subtype more prevalent, the Non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Characterization of activating mutations which affect oncogenes has allowed to define small subgroups of patients that respond to targeted treatments against them, as could be the Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) of EGFR. Nevertheless, around a 30% of patients do not respond to the treatment. Furthermore, in the 70% of the cases where there is a therapeutic response, progression inevitably appears, due to the development of resistances mediated by a big variety of mechanisms. These include the activation of epigenetic mechanisms which mediate histological changes, like the epithelial-mesenchymal transition (EMT). In experimental models *in vitro* of NSCLC that reproduce the acquisition of resistance to the TKIs, we have identified the overexpression of the

enzyme Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) as a responsible of the metabolomic and epigenetic reprogramming that leads to the phenotype EMT and TKI-resistant. Therefore, NNMT is positioned as a potential therapeutic target. In the present project, it has been developed an analytical method, through liquid chromatography and mass spectrometry, to quantify the enzymatic activity of said protein. In this way, we have been able to compare its activity in different pairs of lung carcinoma cell lines, sensible and resistant to TKIs. Moreover, this method has allowed us to evaluate two inhibitors for NNMT, the 1-methylquinolinium and the 5-methylquinolinium. The results obtained show the effectiveness of these compounds to inhibit the activity of NNMT, becoming potential drugs for targeted therapies against this type of cancer. The developed method will allow the screening of a high number of compounds in preclinical studies.

PALABRAS CLAVE

Carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites, Diana terapèutica, Nicotinamida N-Metiltransferasa, Transició epitelio-mesenquimal, UPLC-MS/MS.

Carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites, Diana terapèutica, Nicotinamida N-Metiltransferasa, Transició epitelio-mesenquimal, UPLC-MS/MS.

Non-small cell lung carcinoma, Therapeutic target, Nicotinamide N-Methyltransferase, Epithelial-mesenchymal transition, UPLC-MS/MS.

Autor del proyecto:

Jorge Císcar Soriano
Grado en Biotecnología

Tutor Académico:

Profesora Eloisa Jantus-Lewintre
Departamento de Biotecnología

Tutor entidad colaboradora:

D. Agustín Gerardo Lahoz Rodríguez
Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, IIS La Fe

València, julio de 2018

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a varias personas y entidades la ayuda que me han prestado para realizar este Trabajo Fin de Grado, que ha conllevado mucho esfuerzo.

En primer lugar, agradecer al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe por la oportunidad de haber desarrollado este proyecto. En esta línea, principalmente agradecer a mis tutores en el centro de investigación, Agustín Lahoz y Marina López, por el apoyo incansable para conseguir que este trabajo salga adelante de la mejor manera posible. Agradecer también a Sandra, Marta, Verónica y al resto de compañeras y compañeros de la Unidad Analítica y la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión del Instituto, que han aportado las herramientas para poder completar este Trabajo Fin de Grado de manera satisfactoria.

Agradecer también a la *Universitat Politècnica de València*, y en especial a mi tutora en esta universidad, la Profesora Eloisa Jantus-Lewintre, por permitirme desarrollar este proyecto para culminar mi Grado en Biotecnología.

También quiero agradecer a mis amigos por todo el ánimo que me han dado para que este proyecto pudiera salir adelante, por hacer que la rutina y el esfuerzo se hicieran más amenas. A Badr, Paula, Carles, Marta, Agustín o Unai, sin vosotros hubiera sido mucho más difícil.

Finalmente agradecer a mi familia su apoyo incondicional desde que empecé en la universidad, además del esfuerzo que realizan para que estos 4 años hayan sido posibles. Agradecer su comprensión, cariño y apoyo para que no desesperara nunca.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer de pulmón.....	1
1.1.1. Clasificación histológica del cáncer de pulmón	2
1.1.2. Genética del Cáncer de Pulmón No Microcítico	2
1.1.2.1. Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM.....	3
1.1.3. Tratamientos para el CPNM y terapias dirigidas	5
1.1.4. Mecanismos de resistencia a la terapia anti-EGFR.....	6
1.2. Transición epitelial-mesenquimal	6
1.2.1. EMT y cáncer	7
1.3. Nicotinamida N-Metiltransferasa	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Reactivos	10
3.2. Líneas celulares sensibles y resistentes a ITQs.....	10
3.3. Procesado de la muestra.....	11
3.4. Análisis mediante UPLC-MS/MS.....	11
3.5. Preparación de disoluciones estándar y curvas de calibración.....	12
3.6. Normalización por cuantificación total de proteína	12
3.7. Análisis estadístico.	13
4. RESULTADOS	14
4.1. Puesta a punto del método UPLC-MS/MS.....	14
4.2. Actividad comparada de NNMT en líneas celulares de CPNM sensibles y resistentes a ITQs	15
4.3. Evaluación de la actividad de inhibidores de NNMT.....	17
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES	23
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Número de casos nuevos y mortalidad por cáncer en el mundo. Fuente: GLOBOCAN 2012 (IARC) (Globocan, http://gco.iarc.fr/today)	1
Figura 1.2. Principales oncogenes mutados en AC pulmonar. Adaptado de Pulido (2017)	3
Figura 1.3. Ruta de KRAS y EGFR con representación de varios elementos de la vía de transducción de la señal mutados en el AC pulmonar. (Huang y Fu (2015)).....	5
Figura 1.4. Papel de NNMT en el contexto de la ruta de la metionina y la síntesis de NAD. Adaptado de Shlomi y Rabinowitz (2013).	8
Figura 4.1. Cromatogramas obtenidos con el método de UPLC-MS/MS de los compuestos en estudio, utilizando una disolución patrón a 600nM. a) 1-MQ, b) NAM, c) 1-MNA y d) 1-MNA-D3.	15
Figura 4.2. Comparación de los niveles de 1-MNA en muestras celulares (nmoles/mg de proteína total) de CPNM sensibles a ITQs (HCC827 y P303) y resistentes (HCC827 ER23 y P303-AZDR).	16
Figura 4.3. Comparación de los niveles de 1-MNA en muestras celulares (nmoles/mg de proteína total) de HCC827-ER23 para distintas concentraciones de inhibidor. A) 1-MQ y B) 5-MQ.....	18
Figura 4.4. Niveles de 1-MQ en los extractos celulares (nmoles/mg de proteína total). No se muestra el resto de los análisis porque no se detecto cantidad alguna de inhibidor	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Líneas celulares de CPNM empleadas y su perfil mutacional.	10
Tabla 3.2. Concentraciones de BSA utilizadas para la elaboración de una recta de calibrado para la valoración de proteína.	12
Tabla 4.1. Transiciones, ionización, voltajes del cono y energías de colisión para la determinación de los analitos. 1-MNA-D3 fue utilizado como Patrón Interno (PI).....	14
Tabla 4.2. Resumen de los niveles de los analitos obtenidos en el análisis de líneas celulares de CPNM ITQ sensibles y resistentes, normalizados por la cantidad de proteína total obtenida por Lowry.....	15
Tabla 4.3. Resumen de los niveles de analitos obtenidas en el análisis de la línea celular HCC827-ER23 (línea de CPNM ITQ resistente), utilizando distintas concentraciones de los inhibidores de NNMT 1-MQ y 5-MQ. Los datos fueron normalizados por la cantidad de proteína total obtenida por Lowry.....	17
Tabla 4.4. Resultados obtenidos en el análisis simple de la varianza entre las muestras celulares tratadas con los diferentes niveles de inhibidores. Los datos corresponden a la comparación de cada muestra con el control celular.....	19

ABREVIATURAS UTILIZADAS

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
CPM	Cáncer de Pulmón Microcítico
CPNM	Cáncer de Pulmón No Microcítico
SCC	Carcinoma de células escamosas o epidermoide
AC	Adenocarcinoma
LCC	Carcinoma de células grandes
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ITQ	Inhibidor de Tirosina Quinasa
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
MET	Transición mesenquimal-epitelial
NNMT	Nicotinamida N-Metiltransferasa
NAM	Nicotinamida
SAM	S-adenosilmetionina
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
1-MNA	1-metilnicotinamida
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
MS	Espectrometría de masas
QQQ	Triple cuadrupolo
SAH	S-Adenosil L-homocisteína
1-MQ	1-metilquinolinio
5-MQ	5-Metilquinolinio
1-MNA-D3	1-metilnicotinamida-D3
ACN	Acetonitrilo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ESI	Ionización por electroespray
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
BSA	Albúmina de Suero Bovino
PI	Patrón Interno

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de pulmón

El cáncer agrupa a más de 100 enfermedades distintas con diversos factores de riesgo y características epidemiológicas, fenotípicas y genéticas, que se originan a partir de la mayoría de tipos celulares y órganos del cuerpo. Dentro de estos, el cáncer de pulmón es la neoplasia con mayor incidencia y letalidad. Según los datos mundiales disponibles más recientes (2012) ofrecidos por la IARC (del inglés *International Agency for Research on Cancer*), los cánceres más frecuentes son el de pulmón (1,8 millones de casos), seguido por el de mama (1,6 millones de casos) y el colorrectal (1,3 millones de casos). En cuanto a la mortalidad asociada a cada tipo de neoplasia, el cáncer de pulmón vuelve a representar el primero de la lista (1,5 millones de muertes), seguido en este caso del de hígado (740.000 muertes) y el de estómago (720.000 muertes). Como puede observarse en la Figura 1.1, además, presenta una mortalidad mucho más elevada que los otros dos tipos de cáncer con mayor incidencia.

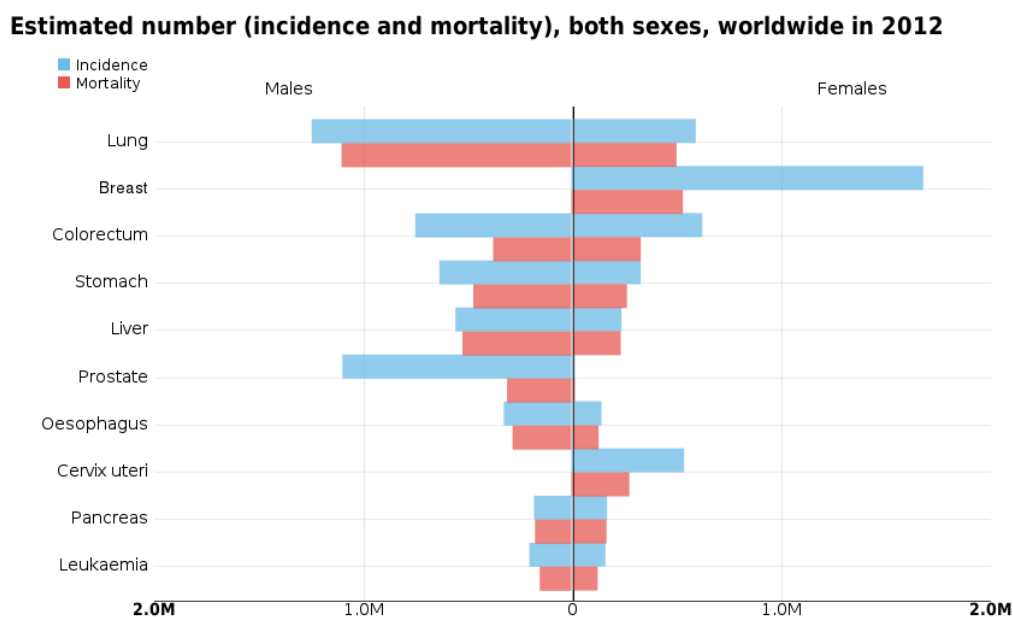


Figura 1.1. Número de casos nuevos y mortalidad por cáncer en el mundo. Fuente: GLOBOCAN 2012 (IARC) (Globocan, <http://gco.iarc.fr/today>).

En el caso de España, más de 25.000 nuevos casos de cáncer de pulmón son diagnosticados cada año, según los últimos datos ofrecidos por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), como muestran Galceran *et al.* (2015). La supervivencia de éstos al cabo de 5 años es únicamente del 15%. Uno de los factores que explican esta elevada mortalidad es el diagnóstico tardío, ya que un nódulo

pulmonar neoplásico puede desarrollarse, e incluso extenderse hasta otros órganos, antes de causar sintomatología en el paciente.

1.1.1. Clasificación histológica del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es un grupo de neoplasias muy heterogéneo, que desde el punto de vista histológico se clasifica en dos grandes grupos, según la morfología que presentan las células tumorales bajo el microscopio: el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPNM). Esta distinción morfológica resulta muy útil, ya que está relacionada con una evolución clínica y unas características moleculares distintivas. El CPNM representa el tipo histológico más frecuente, constituyendo aproximadamente el 80% del total de los casos, y es el objeto de estudio de este proyecto. Este tipo histológico puede dividirse, a su vez, en tres subtipos diferentes (Minna *et al.*, 2002):

- a. **Carcinoma de células escamosas o epidermoide (SCC).** Representa el subtipo más relacionado con el tabaco y con el sexo masculino. Estos tumores crecen generalmente en la parte central del tumor, afectando a los bronquios de mayor tamaño.
- b. **Adenocarcinoma (AC).** Es la forma más común de cáncer de pulmón, y representa el subtipo menos afectado por el sexo, la edad y el hábito de fumar, aunque la mayoría de los casos se desarrolle en fumadores.
- c. **Carcinoma de células grandes (LCC).** Es el subtipo menos frecuente. Las células que lo forman son grandes y no presentan una diferenciación especial. Tienen una localización periférica y casi todos se desarrollan en fumadores.

En muchas ocasiones, la mera observación de la morfología no permite un diagnóstico adecuado del subtipo histológico. Para solucionar este problema se utilizan marcadores inmunohistoquímicos. Entre ellos destaca el factor de transcripción de la tiroides (NKX2-1, también denominado TTF1) que es un marcador muy específico de los AC y muy útil en el reconocimiento de la metástasis (Reckhtman *et al.*, 2011).

1.1.2. Genética del Cáncer de Pulmón No Microcítico

En el CPNM se han identificado centenares de alteraciones genéticas, que incluyen mutaciones puntuales en la secuencia del ADN, alteraciones en el número de copias de genes y grandes reordenamientos cromosómicos (Sato *et al.*, 2007). Muchos de estos cambios se han encontrado en el epitelio normal, lo que sugiere que el desarrollo del CPNM se debe a un proceso secuencial que incluye cambios genéticos

sucesivos. Por otra parte, también se han observado alteraciones epigenéticas, como la hipermetilación de las islas CpG (Heller *et al.*, 2013). Existe una gran variabilidad en el número de mutaciones puntuales para cada genoma tumoral, explicable por la exposición a agentes mutagénicos o por defectos en la maquinaria del ADN (Sjoblom *et al.*, 2006). Algunos de los nuevos genes de cáncer identificados están involucrados en procesos hasta ahora no relacionados directamente con la carcinogénesis, como el metabolismo (Yan *et al.*, 2009), la regulación epigenética (Morin *et al.*, 2010), la homeostasis proteica (Chapman *et al.*, 2011) y la diferenciación celular (Agrawal *et al.*, 2011).

1.1.2.1. Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM

El CPNM presenta, desde el punto de vista genético, una gran heterogeneidad. En el AC pulmonar encontramos mutaciones que favorecen la proliferación en varios oncogenes, siendo las más frecuentes las que afectan a *KRAS*, al receptor del factor de crecimiento epitelial (*EGFR*, por sus siglas en inglés), y en menor medida a *ALK* o *HER2*. En una proporción importante de los casos, no obstante, todavía no se ha identificado el oncogén responsable del tumor, como puede observarse en la Figura 1.2.

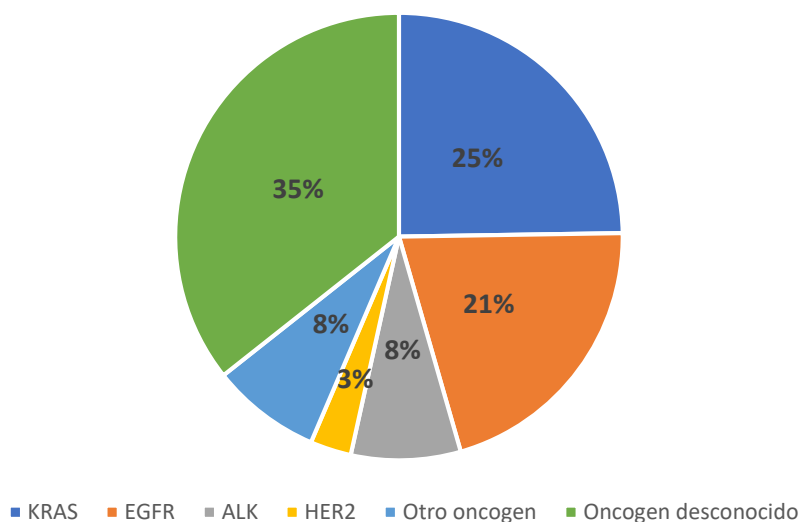


Figura 1.2. Principales oncogenes mutados en AC pulmonar. Adaptado de Pulido (2017).

- a) *KRAS*. Es un miembro de la familia *RAS* que codifica proteínas G con actividad GTPasa. Cuando *RAS* está unido a GTP activa efectores que participan en rutas de proliferación, diferenciación y apoptosis, principalmente a través de la activación de las MAP quinasas (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011). Las mutaciones en *KRAS* se encuentran en aproximadamente el 25% de los pacientes de CPNM, además de en otros tipos de cáncer.

b) *EGFR*. El receptor del factor de crecimiento epidérmico es una proteína con una región transmembrana, 4 dominios extracelulares y 3 dominios intracelulares. En la región extracelular se produce la unión al ligando, que induce la dimerización del receptor. El componente intracelular de EGFR presenta una región con actividad tirosina quinasa, que se ve aumentada tras la dimerización junto con la autofosforilación del receptor. Este cambio permite la interacción con GBR2, posteriormente con la proteína SOS y la consiguiente activación de RAS. Paralelamente, EGFR transduce la señal a través de la ruta PI3K, que lleva a la activación de la proteína quinasa mTOR, un regulador fundamental de la síntesis de proteínas. Algunas de las mutaciones que afectan al dominio quinasa catalítico de EGFR provocan que esté constitutivamente activo, lo que conlleva una especial sensibilidad de los tumores a los inhibidores de tirosina quinasa (ITQs), interesante desde el punto de vista terapéutico (Paez *et al.*, 2004) y punto de partida de este proyecto.

Cabe destacar que las alteraciones en *KRAS* y *EGFR* son mutuamente excluyentes: todas ellas impiden la hidrólisis del GTP manteniendo KRAS constitutivamente activado, promoviendo las rutas de señalización RAF/MEK/ERK y PI3K/ AKT/mTOR (Figura 1.3).

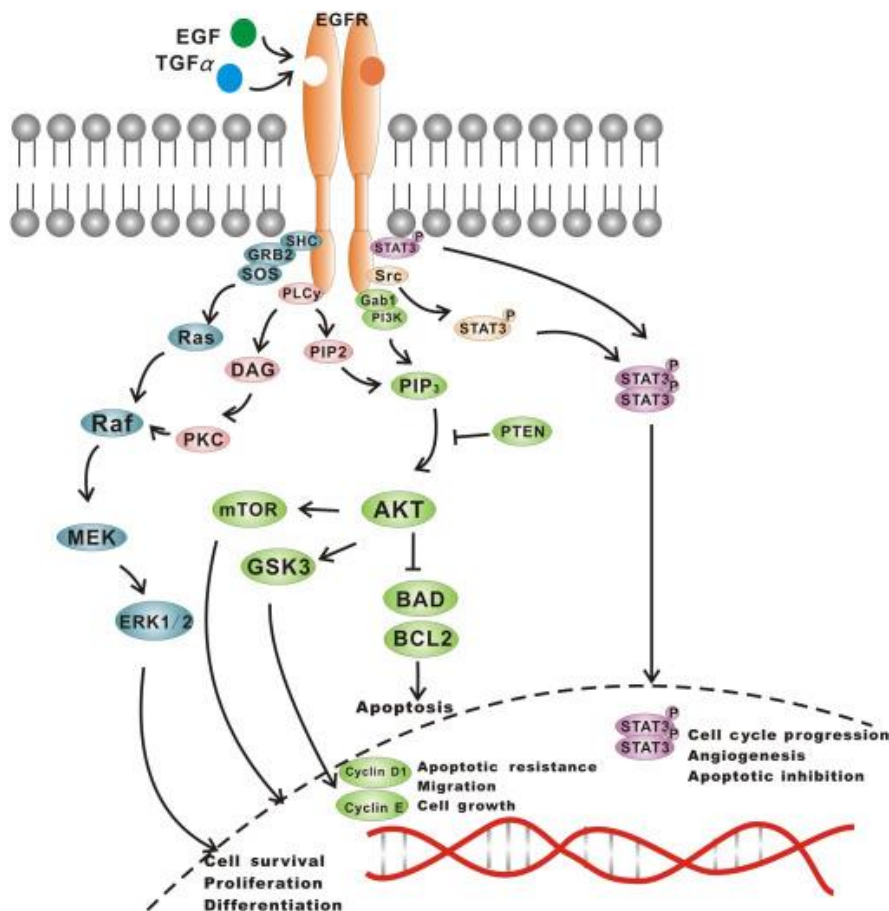


Figura 1.3. Ruta de KRAS y EGFR con representación de varios elementos de la vía de transducción de la señal mutados en el AC pulmonar (Huang y Fu (2015)).

1.1.3. Tratamientos para el CPNM y terapias dirigidas

El tratamiento habitual para el CPNM en estadios iniciales ha sido, y continúa siendo, la cirugía. No obstante, la mayoría de los pacientes se diagnostican cuando la enfermedad ya está avanzada y se consideran inoperables, quedando como únicas opciones, ineficaces en la mayoría de los casos, la quimioterapia convencional y la radioterapia. Por ello, la caracterización genética y el reciente desarrollo de fármacos dirigidos contra dianas moleculares ha supuesto un gran avance para el tratamiento de estos pacientes. Los últimos avances en el desarrollo de inhibidores específicos, paralelamente a la caracterización de las alteraciones moleculares, han permitido la aplicación de la llamada medicina de precisión, un nuevo paradigma en el que los pacientes oncológicos son tratados con terapias dirigidas contra alteraciones oncogénicas específicas que dirigen al tumor (Chan y Hughes, 2015).

En el caso del CPNM, los esfuerzos para sintetizar inhibidores específicos de EGFR llevaron al desarrollo del erlotinib (*Tarceva*®, *OSI Pharmaceuticals*) y el gefitinib (*Iressa*®, *AstraZeneca*) que inhiben de manera eficaz la actividad tirosina quinasa de la forma mutante del receptor. Estos dos ITQs están aprobados como tratamiento de primera línea para el CPNM refractario y avanzado con *EGFR* mutado, dado que han demostrado mejores respuestas que la quimioterapia citotóxica estándar (Douillard *et al.*, 2014). Estos ITQs son compuestos capaces de inhibir de forma reversible la catálisis, ocupando el sitio de unión del ATP. En casi todos los pacientes, y pese a la buena respuesta inicial, se acaban desarrollando resistencias a estos ITQs, llamados de primera generación, En aproximadamente un 50% de los casos aparece una nueva mutación (la sustitución T790M) que aumenta la afinidad por el ATP, haciendo que estos inhibidores reversibles pierdan su eficacia.

Los ITQs de segunda generación como el neratinib, el afatinib y el dacomitinib, se han desarrollado para superar este problema, ya que se unen covalentemente y de manera irreversible a EGFR. *In vitro*, son capaces de disminuir la activación de EGFR, así como la proliferación en células de AC *EGFR* mutado con la mutación T790M (Engelman *et al.*, 2007). Sin embargo, la eficacia clínica de esta segunda generación de inhibidores ha sido baja, con un porcentaje de respuesta inferior al 10% en pacientes con enfermedad progresiva tras el tratamiento con erlotinib o gefitinib. Es por ello por lo

que se han desarrollado nuevos inhibidores selectivos e irreversibles, como el rociletinib (CO-1686) y el osimertinib (AZD9291).

1.1.4. Mecanismos de resistencia a la terapia anti-EGFR

Pese a los avances en las terapias dirigidas y quimioterápicas, el pronóstico de los pacientes de CPNM sigue siendo malo. Como ya se ha introducido, uno de los problemas para este pronóstico es la resistencia al tratamiento, porque la enfermedad no responde a la terapia (resistencia innata) o por la aparición de una recaída tras una respuesta satisfactoria (resistencia adquirida). Esto puede llevar a probar un aumento en las dosis, lo que suele aumentar los efectos adversos e incluso puede no mejorar el pronóstico. En el caso de la terapia dirigida contra EGFR, y pese a los buenos resultados iniciales, es esperable que la mayoría de los pacientes acaben desarrollando resistencias. La mutación T790M es el principal mecanismo de resistencia a los ITQs de EGFR de primera y segundo generación, llegándose a encontrar en alrededor del 60-70% de los casos de recaída. De hecho, la mutación T790M comprende a más del 90% de las mutaciones en *EGFR* (Costa *et al.*, 2007). Otro de los mecanismos que conllevan resistencia a los ITQs es la transformación fenotípica en ausencia de otras alteraciones genéticas, es decir, mediante mecanismos epigenéticos. Esta transformación se puede dividir en dos clases: la transformación a CPM y la transformación epitelio-mesenquimal (EMT). La transformación de tumores CPNM *EGFR* mutado, mayoritariamente AC, a CPM se ha detectado en un 2-14% de los pacientes con resistencia adquirida a ITQs de EGFR (Sequist *et al.*, 2011). Aunque los mecanismos para esta transformación se desconocen, sí que se ha podido comprobar que la mutación original en *EGFR* sigue estando presente en el nuevo CPM. El segundo proceso de transformación fenotípica, la EMT, se explicará a continuación.

1.2. Transición epitelial-mesenquimal

La EMT es un programa de transdiferenciación que convierte células de fenotipo epitelial en mesenquimales. La EMT ocurre de manera fisiológica durante el desarrollo embrionario para asegurar las interconexiones requeridas que formarán los distintos tipos celulares, tejidos y órganos en metazoos complejos (Chen *et al.*, 2017). Este programa biológico está orquestado y perfectamente regulado por un conjunto de factores de transcripción, entre los que se incluyen las familias de SNAIL, TWIST y ZEB. El programa EMT se puede activar muy rápidamente en células epiteliales en respuesta a señales fisiológicas, como ocurre durante la gastrulación o como respuesta al daño tisular. Después de la migración y el aumento del número celular, la plasticidad celular intrínseca permite a las células que han activado la EMT de manera parcial revertir el

fenotipo a un estado epitelial mediante la transición mesenquimal-epitelial (MET). Esta conversión tan rápida, entre los estados epitelial y mesenquimal, está regulada por señales inductoras de EMT como el TGF β , principal inductor del EMT durante el desarrollo embrionario y en la progresión tumoral (Heldin *et al.*, 2012).

1.2.1. EMT y cáncer

Durante la progresión del cáncer, las células neoplásicas entran en una transición dinámica y reversible entre múltiples estados fenotípicos, los extremos de los cuales se definen por la expresión de fenotipos parcialmente epiteliales o mesenquimales. La mayor parte del tumor presenta características epiteliales, pero determinadas regiones, como el frente invasivo, adquieren un fenotipo más mesenquimal. De esta manera, la plasticidad inherente al programa EMT es vital para la progresión tumoral, y es aprovechada para realizar la colonización metastásica (Kang y Massagué, 2004). Mientras que se requieren un gran número de alteraciones genéticas y epigenéticas para la formación de un tumor primario, es posible que para su diseminación no se requieran mutaciones adicionales (Morel *et al.*, 2012). De este modo, la expresión del programa EMT en células tumorales -en principio no metastásicas- aumenta la habilidad de estas células para generar metástasis sin necesidad de cambios genéticos adicionales. La EMT es, además, un mecanismo importante en la aparición de resistencia a las terapias antitumorales convencionales. Hay muchos estudios que sugieren que las alteraciones epigenéticas reversibles observadas en la adquisición de resistencia reflejan cambios en el estado de diferenciación del tumor, dirigidos por el programa EMT (Voulgari y Pintzas 2009). En el caso que nos atañe, numerosas evidencias experimentales y clínicas relacionan la activación del programa EMT con la resistencia a ITQs en CPNM (Soucheray *et al.*, 2015).

1.3. Nicotinamida N-Metiltransferasa

La Nicotinamida N-Metiltransferasa (NNMT) es una enzima cuya función fisiológica principal consiste en la metabolización por metilación del exceso de la nicotinamida (NAM) para su posterior eliminación urinaria, utilizando la S-adenosilmetionina (SAM) como dador de metilos. La acción sobre estos dos reactivos conlleva que la NNMT tenga un papel en la ruta de la metionina y en la síntesis de Nicotina Adenina Dinucleótido (NAD) por una de sus vías principales, el *salvage pathway*, como puede observarse en la Figura 1.4.

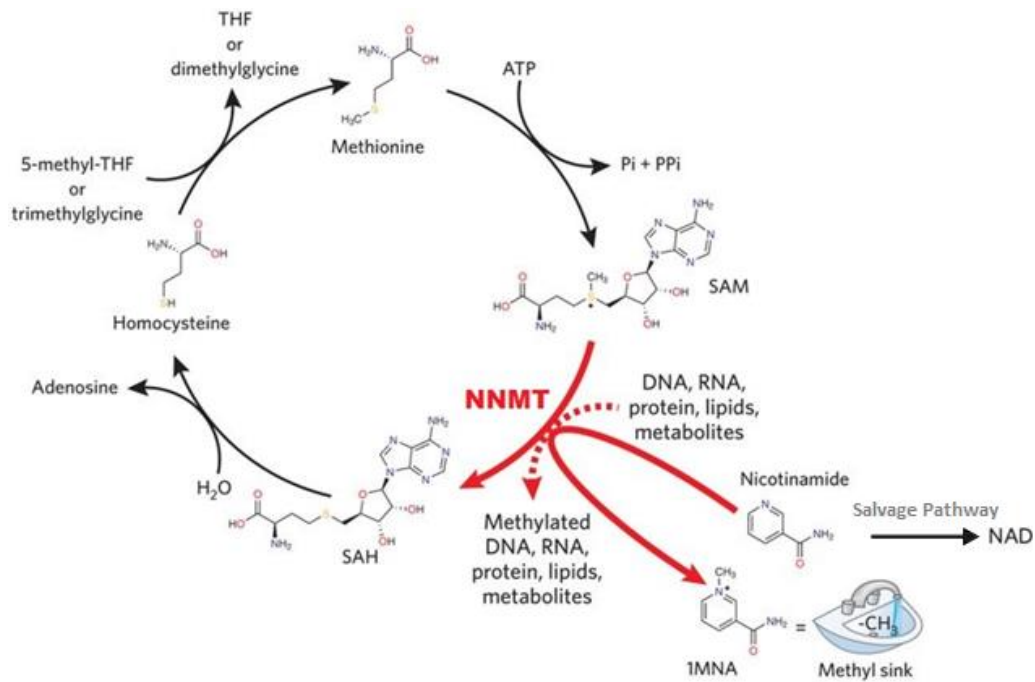


Figura 1.4. Papel de NNMT en el contexto de la ruta de la metionina y la síntesis de NAD. Adaptado de Shlomi y Rabinowitz (2013).

Estudios previos realizados por el equipo de investigación de este proyecto, mediante análisis multi-ómico integrativo de la resistencia a ITQs, demostraron la sobreexpresión de este enzima en modelos experimentales de CPNM que reproducen la adquisición de resistencia a los ITQs. Los resultados obtenidos demostraron que la elevada actividad NNMT, característica diferencial de las células ITQ-resistentes con fenotipo EMT, es necesaria para mantener el estado mesenquimal, resistente a la terapia e invasivo. El papel fundamental de esta enzima en el contexto de la adquisición de resistencia de las células de CPNM la convierte, por lo tanto, en una potencial diana terapéutica.

2. OBJETIVOS

Los ITQs se han posicionado como la mejor terapia frente a los CPNM producidos por las mutaciones activadoras de *EGFR*, una de las principales causas de este tipo de cáncer. No obstante, pese a las buenas respuestas iniciales de estos ITQs, los tumores acaban desarrollando resistencias a través de mecanismos genéticos y epigenéticos. La activación del fenotipo EMT se ha visto como una de las mayores causas de la aparición de estas resistencias, y la enzima NNMT como una de las responsables de la reprogramación que dirige a dicho fenotipo. Por tanto, la NNMT se posiciona como una potencial diana terapéutica.

De esta manera, el objetivo general del presente proyecto es la puesta a punto de un método analítico, mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) acoplada a un equipo de espectrometría de masas (MS) de triple cuadrupolo (QQQ), para poder cuantificar de manera sencilla y efectiva la actividad enzimática de la NNMT. Este método permitirá:

1. La valoración enzimática comparativa de NNMT en líneas celulares de CPNM, sensibles y resistentes a los ITQs.
2. La evaluación de dos inhibidores para dicha enzima en modelos celulares de CPNM ITQs resistentes. Como la NNMT puede ser inhibida por sus propios productos de reacción, 1-MNA y S-Adenosil L-homocisteína (SAH), se probará la eficacia de dos análogos de la 1-MNA, el 1-metilquinolinio (1-MQ) y el 5-metilquinolinio (5-MQ).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Metanol, agua y acetonitrilo (ACN) utilizados fueron de grado adecuado para cromatografía líquida-espectrometría de masas y fueron adquiridos a *Fisher Scientific (Loughborough, UK)*. 1-metilnicotinamida-D3 (1-MNA-D3) fue obtenida de *Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)*. El resto de los estándares y reactivos, incluyendo el acetato amónico y el amoniaco, aditivos para la cromatografía líquida, fueron comprados a *Sigma-Aldrich (Madrid, España)*.

3.2. Líneas celulares sensibles y resistentes a ITQs

En el presente proyecto se han utilizado líneas celulares de AC pulmonar con *EGFR* mutado, como es la HCC827, procedente de la *American Type Culture Collection (ATCC)*. También, se utilizó una línea derivada de un AC de paciente, producida en el laboratorio de la Dra. Rosa Farrás y amablemente cedida a nuestro grupo, denominada P303. A partir de las dos líneas celulares citadas se generaron sus correspondientes líneas resistentes (Tabla 3.1), aislando clones y tratándolos de forma crónica con concentraciones crecientes de los distintos ITQs hasta la adquisición de la resistencia. Todas las células resistentes eran capaces de proliferar con normalidad en presencia de concentraciones de 10µM. Para confirmar la resistencia a los ITQs se realizaron ensayos de viabilidad celular, basados en el azul tripán, colorante vital que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Para realizar el conteo celular, tras la tripsinización y resuspensión en medio completo, se mezcló una alícuota de la suspensión celular obtenida con el mismo volumen de una solución de azul tripán al 0.4% (Invitrogen) y se cargó en unas cámaras de conteo especiales y específicas para este aparato (*Countess® cell counting chamber slides; Invitrogen*)

Tabla 3.1. Líneas celulares de CPNM empleadas y su perfil mutacional.

Línea Celular	Mutación	Línea resistente
HCC827	Deleción del exón 19 (E746-A750)	HCC827-ER23 (erlotinib)
P303	Deleción del exón 19 (E746-A750)	P303-AZDR (osimertinib)

Las líneas celulares de AC pulmonar se cultivaron en medio completo compuesto por los siguientes componentes:

- 90% RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (*Gibco®*, *Life Technologies*).
- 10% de Suero bovino fetal inactivado (*Gibco®*, *Life Technologies*).
- 100 U/ml de penicilina (*Gibco®*, *Life Technologies*).
- 100 µg/ml de estreptomina (*Gibco®*, *Life Technologies*).
- 0,25 µg/ml de fungizona (*Gibco®*, *Life Technologies*).

3.3. Procesado de la muestra

Las muestras biológicas procedentes de cultivos celulares fueron procesadas desde su cultivo en monocapa para el análisis por espectrometría de masas. Las placas se rascaron en dos ciclos, uno con 600 µl y otro con 400µl de H₂O. Posteriormente, se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación para asegurar una correcta lisis celular. A continuación, se tomó una alícuota de 100µl a la que se añadió 50 µl de una disolución 1,5M de NaOH, para valorar la proteína total por Lowry. Para el análisis por UPLC-MS/MS se tomó una alícuota de 200 µl de muestra, a la que se añadieron 750µl de CH₃OH:CHCl₃ (9:1), para eliminar proteínas y restos celulares. Se realizó en este punto un ciclo de congelación a -20°C, y una posterior centrifugación en frío (4°C) durante 15 minutos a 15.000g. A continuación, se prepararon tres fracciones: una fracción tomando 800µl para detectar los analitos menos concentrados, una fracción tomando 20 µl (dilución 1/20) para los analitos más concentrados. A estas dos fracciones se les añadieron 20µl de una dilución de patrón interno (1-MNA-d3) a 100 ppb. Se realizó entonces una concentración a sequedad, mediante un equipo de *SpeedVac* (*Savant speedvac concentrator*, *Thermo Electro Corporation*). Por último, los sobrenadantes se resuspendieron en 100µl de una disolución 95:5 de ACN: H₂O 20mM acetato amónico y 20mM de amoniaco, condiciones iniciales de la fase móvil en la posterior etapa de cromatografía líquida.

3.4. Análisis mediante UPLC-MS/MS

El análisis de las muestras se realizó mediante cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). El sistema utilizado consistió en un *Acquity UPLC system* acoplado a un espectrómetro de masas *Xevo QQQ* equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), ambos de la compañía *Waters* (Manchester, Reino Unido). El software utilizado para el análisis de datos fue *MassLynx v4.1* (*Waters*).

3.5. Preparación de disoluciones estándar y curvas de calibración

Se prepararon disoluciones madre estándar para cada analito y patrón interno individualmente a concentraciones de 1 mg/ml, en un disolvente apropiado según las recomendaciones de proveedor. Las disoluciones de trabajo para cada analito y patrón interno se obtuvieron diluyendo las disoluciones madre en una disolución 95:5 de ACN: H₂O 20mM acetato amónico y 20mM de amoniaco, condiciones iniciales de la fase móvil en el proceso de cromatografía líquida. Se prepararon curvas de calibración estándar, con concentraciones en un rango de 1,2-5000 nM, por diluciones seriadas de la solución madre mixta. La concentración del patrón interno se mantuvo constante en todos los puntos de calibración, a 100 nM.

3.6. Normalización por cuantificación total de proteína

Los datos de concentración de analitos obtenidos por el UPLC-MS/MS fueron normalizados mediante la valoración de proteína total en microplaca por el método de Lowry, para que pudieran compararse entre ellos correctamente. Para este proceso se utilizó una disolución 100:1:1 en agua de los reactivos; carbonato sódico 4% (A), tartrato de sodio y potasio 4% (B) y sulfato de cobre 2% (C). Se utilizó también el reactivo de Follin, diluido en H₂O 1:1, partiendo de una concentración de 2N, además de Albúmina de Suero Bovino (BSA), a una concentración de 1 mg/ml en NaOH (0,5N). Previamente a la valoración de la proteína se preparó una recta patrón, siguiendo las concentraciones expuestas en la Tabla 3.2 dispuestas sobre una microplaca de 96 pocillos y valorando puntos dobles:

Tabla 3.2. Concentraciones de BSA utilizadas para la elaboración de una recta de calibrado para la valoración de proteína.

Concentración	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	1
μl NaOH 0.5%	50	45	40	35	30	20	10	0
μl BSA 1mg/ml	0	5	10	15	20	30	40	50

La proteína total de las líneas celulares se valoró a dos volúmenes, a 50 y a 25μl, utilizando puntos dobles. En ambos casos, se añadió en primer lugar 125 μl de disolución A-B-C a cada pocillo. Tras una espera de 10 minutos, protegiendo la placa de la luz para evitar degradación, se añadió 25 μl de reactivo de Follin a cada pocillo. A continuación, se realizó una nueva espera de 30 minutos, manteniendo la placa en oscuridad. La lectura se realizó con el lector de Absorbancia *Synergy H1 Biotek* de

placas de 96 pocillos. El procesado de los datos se realizó con el software Gene 5 3.02 a una longitud de onda de 620 nm. La cantidad de proteína total se calculó interpolando los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra en la recta patrón.

3.7. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa libre R (*R Core Team 2014*) aplicando el paquete RStudio. Las diferencias significativas se seleccionaron de acuerdo con el *p valor*, calculado con una prueba de *t-student* para comparaciones por pares o con un análisis de varianza (ANOVA), para comparaciones entre diferentes grupos, con la corrección de Benjamini-Hochberg (*False Discovery Rate, FDR*).

4. RESULTADOS

4.1. Puesta a punto del método UPLC-MS/MS

Las condiciones de cromatografía líquida y de espectrometría de masas fueron optimizadas, hasta la puesta a punto del siguiente método analítico. La separación por UPLC fue realizada utilizando una columna *Acquity UPLC BEH Amide* (1.7µm, 2.1x100mm *Waters*). Las temperaturas de la columna y del inyector automático fueron fijadas a 40°C y 7°C respectivamente. El volumen de inyección de la muestra fue de 4 µl. Las fases móviles utilizadas fueron 20mM de acetato amónico y 20mM de amoniaco en agua (A) y ACN (B). El flujo fue fijado a 0,2 ml/min. Se utilizó un gradiente de elución de 13 minutos con las siguientes condiciones: la composición inicial del eluyente consistía en un 95% de B y un 5% de A, mantenido durante 1,5 minutos, después la proporción de A aumentó hasta un 60% en el minuto 6, seguida por un aumento hasta el 80%, alcanzada en el minuto 8. Finalmente, se produjo una rápida vuelta a las condiciones iniciales en el minuto 8,1, mantenida durante 5 minutos para el acondicionamiento de la columna. Los analitos fueron determinados usando *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) con un modo de ionización positiva. El voltaje del capilar se estableció a 3 kV. Se utilizó una temperatura de fuente de 120°C y una temperatura de desolvatación de 380°C. Los flujos de desolvatación y de cono de gas fueron de 800 l/h y 150 l/h respectivamente, con un gas de colisión a 0,25 ml/min. Las transiciones, voltajes del cono y energías de colisión se ajustaron automáticamente para cada analito utilizando el software *QuanOptimizer*. La Tabla 4.1 proporciona información detallada sobre el análisis y la cuantificación.

Tabla 4.1. Transiciones, ionización, voltajes del cono y energías de colisión para la determinación de los analitos. 1-MNA-D3 fue utilizado como Patrón Interno (PI).

Analito	Ionización	Ion precursor	Ion producto (Cuant.)	Ion producto (Verificación)	Cono (V)	Colisión (V)
NAM	ESI+	123,1	80,1	78	40	20
1-MNA	ESI+	137,1	94	92	60	15
1.MQ	ESI+	145	145	77,94	30	20/30
1-MNA-D3 (PI)	ESI+	140,1	97	-	60	15

Los cromatogramas obtenidos con las condiciones de UPLC-MS/MS descritas anteriormente se muestran en la Figura 4.1.

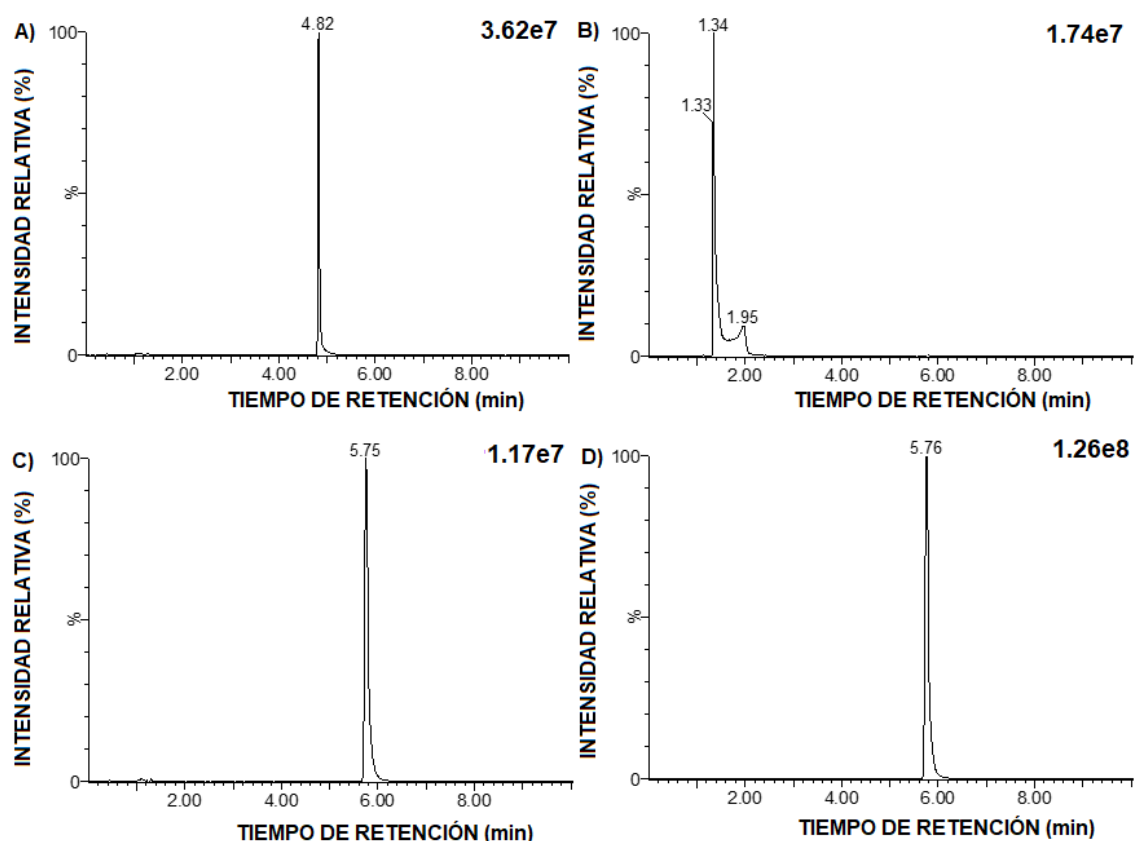


Figura 4.1. Cromatogramas obtenidos con el método de UPLC-MS/MS de los compuestos en estudio, utilizando una disolución patrón a 600nM. A) 1-MQ, B) NAM, C) 1-MNA-D3 y D) 1-MNA.

4.2. Actividad comparada de NNMT en líneas celulares de CPNM sensibles y resistentes a ITQs

La actividad de NNMT fue medida en dos líneas celulares de CPNM resistentes a ITQs (P303 AZDR y HCC827-ER23) y sensibles (HCC827 y P303). Los datos obtenidos se detallan en la Tabla 4.2 y corresponden a las muestras diluidas, al encontrarse la señal del analito 1-MNA saturada en las muestras concentradas.

Tabla 4.2. Resumen de los niveles de los analitos obtenidos en el análisis de líneas celulares de CPNM ITQ sensibles y resistentes, normalizados por la cantidad de proteína total obtenida por Lowry.

Muestra celular	Proteína total (mg)	1-MNA		NAM	
		nmoles	nmoles/proteína total	nmoles	nmoles/proteína total
P303-1	0,0119	0,0034	0,2889	0,1629	13,6621
P303-2	0,0095	0,0036	0,3803	0,3172	33,2955

Para comprobar si las diferencias entre las distintas concentraciones de 1-MNA para las líneas celulares resistentes y sensibles a ITQs eran significativas, se realizó una prueba *t-student*. Los *p-valores* obtenidos comparando las líneas sensibles a ITQs con sus correspondientes líneas resistentes fueron <0,0001. En ambos casos, los valores de *p-valor* obtenidos son menores que 0,05, por lo que se puede descartar la hipótesis nula y afirmar la significación de la diferencia obtenida para los valores de cantidad de 1-MNA en muestra.

4.3. Evaluación de la actividad de inhibidores de NNMT

Con el método analítico desarrollado se midió la capacidad inhibitoria de NNMT de dos análogos estructurales de 1-MNA, como son 1-MQ y 5-MQ. Para ello se utilizó la línea HCC827-ER23, línea celular de CPNM ITQs resistente, y se probaron distintas concentraciones de ambos compuestos (10µM y 100µM para 1-MQ, y 10µM, 30µM y 60 µM para 5-MQ). Los datos obtenidos se representan en la Tabla 4.3. Como en el caso anterior se muestran los datos para las muestras celulares diluidas.

Tabla 4.3. Resumen de los niveles de analitos obtenidas en el análisis de la línea celular HCC827-ER23 (línea de CPNM ITQ resistente), utilizando distintas concentraciones de los inhibidores de NNMT 1-MQ y 5-MQ. Los datos fueron normalizados por la cantidad de proteína total obtenida por Lowry.

Muestra celular	Proteína total (mg)	1-MNA		NAM	
		nmoles	nmoles/ mg proteína total	nMoles	nmoles/ mg proteína total
Control-1	0,6875	0,0923	0,1342	0,8330	1,2116
Control-2	0,949	0,0842	0,0888	0,5191	0,5469
Control-3	0,754	0,0836	0,1109	0,3894	0,5164
1MQ 10 µM-2	0,867	0,0997	0,1150	0,3030	0,3495
1MQ 10 µM-2	0,911	0,0898	0,0985	0,4150	0,4555
1MQ 10 µM-2	0,8225	0,1004	0,1221	0,5040	0,6128
1MQ 100 µM-1	0,7125	0,0486	0,0682	0,8314	1,1669
1MQ 100 µM-2	0,889	0,0452	0,0508	0,3431	0,3859
1MQ 100 µM-3	0,7945	0,0464	0,0583	0,7132	0,8976
5MQ 10 µM-1	0,9675	0,0353	0,0364	0,1967	0,2033
5MQ 10 µM-2	0,936	0,0324	0,0346	0,5816	0,6213
5MQ 10 µM-3	0,835	0,0390	0,0466	0,3420	0,4095
5MQ 30 µM-1	0,6345	0,0164	0,0258	0,6318	0,9957

5MQ 30 μM -2	0,934	0,0144	0,0154	0,6012	0,6436
5MQ 30 μM -3	1,079	0,0132	0,0122	0,6009	0,5569
5MQ 60 μM -1	1,0123	0,0136	0,0135	1,0307	1,0182
5MQ 60 μM -2	0,9784	0,0106	0,0108	0,4938	0,5047
5MQ 60 μM -3	0,8791	0,0096	0,0109	0,6943	0,7898

Los datos obtenidos para 1-MNA, analito más importante del análisis al tratarse del producto de la reacción catalizada por NNMT, se representan de manera comparativa para las distintas concentraciones de inhibidores en la Figura 4.3.

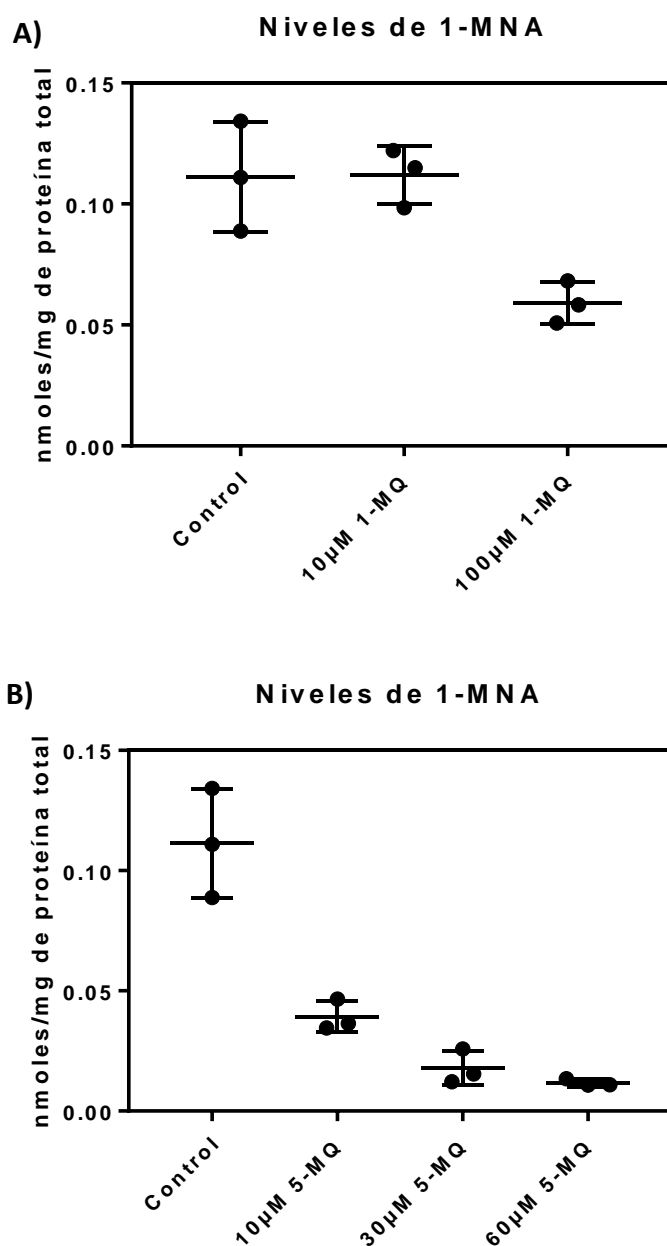


Figura 4.3. Comparación de los niveles de 1-MNA en muestras celulares (nmoles/mg de proteína total) de HCC827-ER23 para distintas concentraciones de inhibidor. A) 1-MQ y B) 5-MQ.

Para comprobar si las diferencias entre los distintos niveles de 1-MQA para las líneas celulares tratadas con inhibidores eran significativas, se realizó un análisis simple de la varianza (ANOVA), comparando las distintas concentraciones de los dos inhibidores con el control. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Resultados obtenidos en el análisis simple de la varianza entre las muestras celulares tratadas con los diferentes niveles de inhibidores. Los datos corresponden a la comparación de cada muestra con el control celular.

Muestra	Diferencia	95% CI of diff.	p-valor ajustado
10µM 1-MQ	-0,0005667	-0,02848 to 0,02735	0,9999
100µM 1-MQ	0,0522	0,02429 to 0,08011	0,0007
10µM 5-MQ	0,0721	0,04419 to 0,1	0,0001
30µM 5-MQ	0,0935	0,06559 to 0,1214	0,0001
60µM 5-MQ	0,09957	0,07165 to 0,1275	0,0001

Con el fin de comprobar la permeabilidad o transporte de este inhibidor en las células ensayadas, se analizó la cantidad de dicho inhibidor en el extracto celular. Esta determinación, nos permitió asociar la disminución de actividad enzimática con la presencia del inhibidor. Como puede observarse en la Figura 4.4, la cantidad de 1-MQ que se detectó en el control celular fue nula. En las muestras celulares donde se incluyó este inhibidor se encontraron niveles progresivos de 1-MQ.

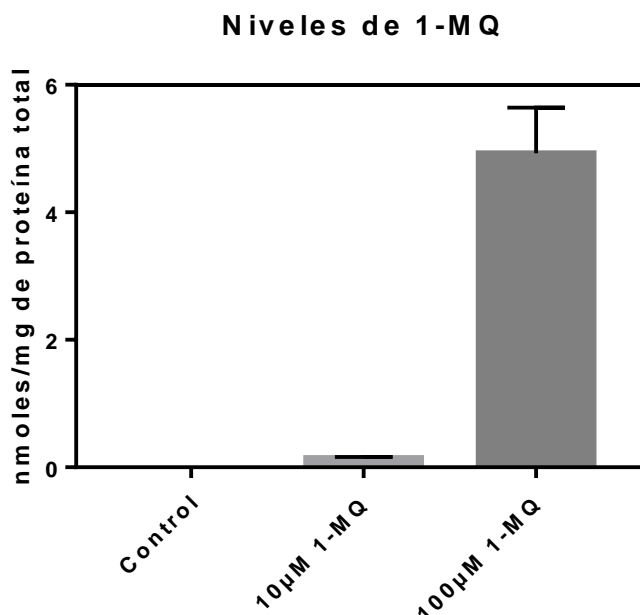


Figura 4.4. Niveles de 1-MQ en los extractos celulares (nmoles/mg de proteína total). No se muestra el resto de los análisis porque no se detectó cantidad alguna de inhibidor.

5. DISCUSIÓN

Estudios previos, llevados a cabo en el laboratorio del presente proyecto, permitieron asociar la sobreexpresión de la enzima NNMT con la adquisición de resistencia a los ITQs en líneas celulares de CPNM, además de con el fenotipo EMT, más invasivo. Por este motivo, desarrollamos un método analítico, basado en UPLC-MS/MS, que nos permitió analizar de manera eficiente la actividad enzimática de NNMT. Este método nos permitiría comparar la actividad entre líneas celulares de CPNM sensibles y resistentes a los ITQs. Además, permitiría probar la eficiencia de dos compuestos (1-MQ y 5-MQ) para inhibir la actividad de dicha enzima. El método analítico desarrollado permite realizar estas dos tareas de manera efectiva, ya que todos los analitos son inequívocamente separados con las condiciones de cromatografía líquida preparadas, como puede observarse en la Figura 4.1 Además, las condiciones de espectrometría de masas descritas permiten detectar y cuantificar eficientemente los niveles de los distintos analitos. La versatilidad del método desarrollado, además, permitiría realizar posteriores cribados de diferentes inhibidores para la enzima NNMT.

Como se ha evidenciado en el apartado 4.2. de este proyecto, la cantidad de 1-MNA es significativamente mayor en las líneas celulares de CPNM resistentes a ITQs (P303-AZDR y HCC827-ER23), que en las mismas líneas celulares donde no se ha desarrollado resistencia. Esta mayor cantidad de 1-MNA implica, necesariamente, una mayor actividad de la enzima NNMT, lo que corrobora los análisis multi-ómicos comparativos, datos de partida de este proyecto. Además, el aumento de la actividad de NNMT ha podido ser demostrado en una línea de CPNM directamente derivada de paciente (P303), lo que evidencia que esta sobreexpresión enzimática que deriva al fenotipo EMT ITQ resistente se podría reproducir en el propio microambiente tumoral del paciente, y no únicamente como un evento en cultivos celulares de líneas representativas de AC pulmonar. De esta manera, el método analítico establecido se convierte en una herramienta eficiente y sencilla para la valoración comparativa de la actividad enzimática de NNMT en líneas celulares de CPNM.

Al probar la relación de la sobreexpresión de NNMT con la adquisición del fenotipo EMT ITQ resistente en las líneas celulares de CPNM, se plantea la posibilidad de probar diferentes inhibidores para dicha enzima, ya que se evidencia como una potencial diana terapéutica. NNMT es una enzima inhibida naturalmente por su producto de reacción, 1-MNA. Partiendo de esta idea, se propuso probar la eficiencia de dos análogos estructurales de la 1-MNA ya desarrollados (Neelakantan *et al.*, 2017): el 1-MQ y el 5-

MQ. Estas moléculas se caracterizan por ser pequeñas moléculas heterocíclicas N-metiladas, conteniendo la estructura aromática del quinolinio. Como se ha visto en el apartado 4.3, la cantidad de 1-MNA se ve reducida en mayor o menor medida tras la adición de estos análogos estructurales. Esta reducción se puede relacionar con una menor actividad de la enzima NNMT, lo que implicaría una inhibición por parte de los compuestos añadidos. En el caso del 1-MQ, no se produce reducción de 1-MNA de manera significativa al añadir dicho compuesto en una concentración de 10 μ M, por lo que se puede deducir que dicha cantidad es insuficiente para producir la inhibición de NNMT. Al añadir el mismo compuesto en una concentración de 100 μ M sí que se produce una reducción significativa de 1-MNA y, consecuentemente, de la actividad de NNMT. Los datos obtenidos con distintas concentraciones de 5-MQ son mucho más prometedores. En las tres concentraciones testadas (10 μ M, 30 μ M y 60 μ M) se produce una reducción significativa de la cantidad de 1-MNA, lo que implica que el compuesto es capaz de inhibir eficientemente la actividad de NNMT. Aunque la concentración más baja probada (10 μ M) ya es capaz de provocar una reducción significativa en la concentración del producto de la reacción, al aumentar la concentración hasta 30 μ M se produce una reducción de la actividad mucho mayor, como se puede observar en la Figura 4.3. No obstante, en esa misma figura se puede observar como al aumentar la concentración hasta 60 μ M no se produce ningún cambio significativo. Esto implica que el inhibidor ha llegado a un punto de saturación, y es incapaz de reducir aún más y de manera eficiente la actividad de NNMT.

Para poder relacionar de manera correcta la reducción en la actividad enzimática de NNMT con la acción de los inhibidores añadidos, el 1-MQ se introdujo en el método analítico desarrollado, para poder medir su concentración en los extractos celulares. Como puede observarse en la Figura 4.4, no se detecta ninguna concentración de este analito en la muestra control, mientras que puede detectarse en las muestras donde se ha añadido 10 μ M y 100 μ M. En esa misma gráfica, no obstante, puede observarse que el aumento en la concentración de 1-MQ detectada en las líneas celulares tratadas no es exactamente de 10 veces, como sería esperable. Las células tratadas con 10 μ M presentan una cantidad de inhibidor menor de lo que cabría esperar. Esta diferencia puede deberse a la dificultad del compuesto para entrar en las células en concentraciones tan bajas. No obstante, el hecho de que se detecte una gran cantidad de inhibidor en las muestras tratadas con 100 μ M demuestra que la inhibición observada se debe a la acción de éste.

De este análisis se puede extraer que el 5-MQ y derivados podrían convertirse en fármacos potenciales capaces de revertir el fenotipo EMT ITQs resistente, haciendo que las células de CPNM sean menos invasivas y presenten una renovada vulnerabilidad metabólica a fármacos ya aprobados para su uso. Si bien el 1-MQ puede inhibir también de manera eficiente la actividad de NNMT, es un inhibidor menos efectivo, por lo que se necesitan unas concentraciones mucho más elevadas para conseguir el mismo efecto. Este hecho podría implicar efectos secundarios no estudiados y toxicidad para el paciente. De la misma manera, la concentración más eficiente testada para el compuesto 5-MQ se encuentra en $30\mu\text{M}$, ya que un aumento de ésta no conlleva ningún cambio significativo y, de nuevo, podría implicar algún tipo de toxicidad para el organismo. No obstante, son necesarios posteriores estudios donde se trabaje con un número de muestras más elevado para poder validar la capacidad inhibitoria del 5-MQ, además de hallar su concentración más eficiente de acción.

6. CONCLUSIONES

- El método de UPLC-MS/MS desarrollado permite evaluar eficientemente la actividad enzimática de NNMT en líneas celulares de CPNM sensibles y resistentes a ITQs.
- La actividad de NNMT es mayor en las líneas celulares de CPNM ITQs resistentes, incluyendo una línea directamente derivada de paciente.
- 5-MQ inhibe eficientemente NNMT, convirtiéndose en un cabeza de serie potencial para desarrollar fármacos capaces de revertir el fenotipo EMT en pacientes que desarrollan resistencia a ITQs.
- El método de UPLC-MS/MS puesto a punto es un método eficiente para realizar el cribado de distintos inhibidores para NNMT en líneas celulares de CPNM.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, N., FREDERICK, M.J., PICKERING, C.R., BETTEGOWDA, C., CHANG, K., LI, R.J., FAKHRY, C., XIE, T.X., ZHANG, J., WANG, J., ZHANG, N., EL-NAGGAR, A.K., JASSER, S.A., WEINSTEIN, J.N., TREVINO, L., DRUMMOND, J.A., MUZNY, D.M., WU, Y., WOOD, L.D., HRUBAN, R.H., WESTRA, W.H., KOCH, W.M., CALIFANO, J.A., GIBBS, R.A., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V.E., PAPADOPOULOS, N., WHEELER, D.A., KINZLER, K.W. and MYERS, J.N., 2011. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6046), pp. 1154-1157.

CHAN, B. A., and HUGHES, B. G., 2015. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research*, 4(1), pp. 36.

CHAPMAN, M.A., LAWRENCE, M.S., KEATS, J.J., CIBULSKIS, K., SOUGNEZ, C., SCHINZEL, A.C., HARVIEW, C.L., BRUNET, J.P., AHMANN, G.J., ADLI, M., ANDERSON, K.C., ARDLIE, K.G., AUCLAIR, D., BAKER, A., BERGSAGEL, P.L., BERNSTEIN, B.E., DRIER, Y., FONSECA, R., GABRIEL, S.B., HOFMEISTER, C.C., JAGANNATH, S., JAKUBOWIAK, A.J., KRISHNAN, A., LEVY, J., LIEFELD, T., LONIAL, S., MAHAN, S., MFUKO, B., MONTI, S., PERKINS, L.M., ONOFRIO, R., PUGH, T.J., RAJKUMAR, S.V., RAMOS, A.H., SIEGEL, D.S., SIVACHENKO, A., STEWART, A.K., TRUDEL, S., VIJ, R., VOET, D., WINCKLER, W., ZIMMERMAN, T., CARPTEN, J., TRENT, J., HAHN, W.C., GARRAWAY, L.A., MEYERSON, M., LANDER, E.S., GETZ, G. and GOLUB, T.R., 2011. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471(7339), pp. 467-472.

CHEN T., YOU Y., JIANG H. and WANG Z.Z., 2017. Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 232(12), pp. 3261-3272.

COSTA, D.B., HALMOS, B., KUMAR, A., SCHUMER, S.T., HUBERMAN, M.S., BOGGON, T.J., TENEN, D.G. and KOBAYASHI, S., 2007. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS medicine*, 4(10), pp. 1679; discussion 1680.

DOUILLARD, J. Y., OSTOROS, G., COBO, M., CIULEANU, T., MCCORMACK, R., WEBSTER, A., and MILENKOVA, T., 2014. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *British journal of cancer*, 110(1), pp. 55.

ENGELMAN, J.A., ZEJNULLAHU, K., MITSUDOMI, T., SONG, Y., HYLAND, C., PARK, J.O., LINDEMAN, N., GALE, C.M., ZHAO, X., CHRISTENSEN, J., KOSAKA, T., HOLMES, A.J., ROGERS, A.M., CAPPUZZO, F., MOK, T., LEE, C., JOHNSON, B.E., CANTLEY, L.C. and JANNE, P.A., 2007a. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5827), pp. 1039-1043

GALCERAN, J., AMEIJIDE, A., CARULLA, M., MATEOS, A., QUIRÓS, J. R., ROJAS, D., ALEMÁN, A., TORRELLA, A., CHICO, M., VICENTE, M. DÍAZ, JM., LARRAÑAGA, N., MARCOS-GRAGERA, R., SÁNCHEZ, MJ, PERUCHA, J.M., FRANCH, P., NAVARRO, C., ARDANAZ, E., BIGORRA, J., RODRIGO, P. and BONET, RP., 2017. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical and Translational Oncology*, 19(7), pp. 799-825.

GLOBOCAN 2012, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, visto el 10 de junio de 2018 <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

HELDIN, C. H., VANLANDEWIJK, M., and MOUSTAKAS, A., 2012. Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS letters*, 586(14), pp. 1959-1970.

HELLER, G., BABINSKY, V. N., ZIEGLER, B., WEINZIERL, M., NOLL, C., ALTENBERGER, C., MÜLLANUER, L., DEKAN, G., GRIN, Y., LANG, G., ENDPFÜTZENREUTER, A., STEINER, I., ZEHETMAYER, S., DÖME, B., ARNS, BM., FONG, KM., WRIGHT, CM., YANG, IA., KLEPETKO, W., POSCH, M., ZIELINSKI, CC. and ZÖCHBAUER-MÜLLER, S., 2012. Genome-wide CpG island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients. *Carcinogenesis*, 34(3), pp. 513-521.

HUANG, L., and FU, L., 2015. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), pp. 390-401.

KANG, Y., and MASSAGUE, J., 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118(3), pp. 277-279.

MOREL, A.P., HINKAL, G.W., THOMAS, C., FAUVET, F., COURTOIS-COX, S., WIERINCKX, A., DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M., TREILLEUX, I., TISSIER, A., GRAS, B., POURCHET, J., PUISIEUX, I., BROWNE, G.J., SPICER, D.B., LACHUER, J., ANSIEAU, S. and PUISIEUX, A., 2012. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS genetics*, 8(5), pp. e1002723.

MORIN, R.D., JOHNSON, N.A., SEVERSON, T.M., MUNGALL, A.J., AN, J., GOYA, R., PAUL, J.E., BOYLE, M., WOOLCOCK, B.W., KUCHENBAUER, F., YAP, D., HUMPHRIES, R.K., GRIFFITH, O.L., SHAH, S., ZHU, H., KIMBARA, M., SHASHKIN, P., CHARLOT, J.F., TCHERPAKOV, M., CORBETT, R., TAM, A., VARHOL, R., SMAILUS, D., MOKSA, M., ZHAO, Y., DELANEY, A., QIAN, H., BIROL, I., SCHEIN, J., MOORE, R., HOLT, R., HORSMAN, D.E., CONNORS, J.M., JONES, S., APARICIO, S., HIRST, M., GASCOYNE, R.D. and MARRA, M.A., 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics*, 42(2), pp. 181-185.

MINNA, J. D., ROTH, J. A. and GAZDAR, A. F., 2002. Focus on lung cancer. *Cancer cell*, 1(1), pp. 49-52.

NEELAKATAN, H., WANG, H. Y., VANCE, V., HOMMEL, J. D., MCHARDY, S. F., and WATOWICH, S. J., 2017. Structure–Activity Relationship for Small Molecule Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase. *Journal of medicinal chemistry*, 60(12), pp. 5015-5028.

PAEZ, J.G., JÄNNE, P.A., LEE, J.C., TRACY, S., GREULICH, H., GABRIEL, S., HERMAN, P., KAYE, F.J., LINDEMAN, N., BOGGON, T.J., NAOKI, K., SASAKI, H., FUJII, Y., ECK, M.J., SELLERS, W.R., JOHNSON, B.E. and MEYERSON, M., 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5676), pp. 1497-1500.

PULIDO, I., 2017. Análisis genómico funcional de la resistencia a las terapias anti-EGFR asociada al fenotipo mesenquimal en el cáncer pulmonar. Tesis Doctoral en Fisiología. Universitat de València, pp. 225.

PYLAYEVA-GUPTA, Y., GRABOCKA, E. and BAR-SAGI, D., 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), pp. 761-774.

REKHTMAN, N., ANG, D.C., SIMA, C.S., TRAVIS, W.D. and MOREIRA, A.L., 2011. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(10), pp. 1348-1359

SATO, H., SHIEN, K., TOMIDA, S., OKAYASU, K., SUZAWA, K., HASHIDA, S., TORIGOE, H., WATANABE, M., YAMAMOTO, H., SOH, J., ASANO, H., TSUKUDA, K., MIYOSHI, S. and TOYOOKA, S., 2017. Targeting the miR- 200c/LIN28B axis in acquired EGFR-TKI resistance non-small cell lung cancer cells harboring EMT features. *Scientific reports*, 7, pp. 40847.

SEQUIST, L.V., WALTMAN, B.A., DIAS-SANTAGATA, D., DIGUMARTHY, S., TURKE, A.B., FIDIAS, P., BERGETHON, K., SHAW, A.T., GETTINGER, S., COSPER, A.K., AKHAVANFARD, S., HEIST, R.S., TEMEL, J., CHRISTENSEN, J.G., WAIN, J.C., LYNCH, T.J., VERNOVSKY, K., MARK, E.J., LANUTI, M., IAFRATE, A.J., MINO-KENUDSON, M. and ENGELMAN, J.A., 2011. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science translational medicine*, 3(75), pp. 75ra26.

SHLOME, T. and RABINOWITZ, J. D., 2013. Metabolism: Cancer mistunes methylation. *Nature chemical biology*, 9(5), pp. 293.

SJOBLOM, T., JONES, S., WOOD, L.D., PARSONS, D.W., LIN, J., BARBER, T.D., MANDELKER, D., LEARY, R.J., PTAK, J., SILLIMAN, N., SZABO, S., BUCKHAULTS, P., FARRELL, C., MEEH, P., MARKOWITZ, S.D., WILLIS, J., DAWSON, D., WILLSON, J.K., GAZDAR, A.F., HARTIGAN, J., WU, L., LIU, C., PARMIGIANI, G., PARK, B.H., BACHMAN, K.E., PAPADOPOULOS, N., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. and VELCULESCU, V.E., 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5797), pp. 268-274.

SOUCHERAY, M., CAPELLETTI, M., PULIDO, I., KUANG, Y., PAWELETZ, C.P., BECKER, J.H., KIKUCHI, E., XU, C., PATEL, T.B., AL-SHAHROUR, F., CARRETERO, J., WONG, K., JÄNNE, P.A., SHAPIRO, G.I. and SHIMAMURA, T., 2015. Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Research*, 75(20), pp. 4372-4383.

VOULGARI, A. and PINTZAS, A., 2009. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica et biophysica acta*, 1796(2), pp. 75-90.

YAN, H., PARSONS, D.W., JIN, G., MCLENDON, R., RASHEED, B.A., YUAN, W., KOS, I., BATINIC-HABERLE, I., JONES, S., RIGGINS, G.J., FRIEDMAN, H., FRIEDMAN, A., REARDON, D., HERNDON, J., KINZLER, K.W., VELCULESCU, V.E., VOGELSTEIN, B. and BIGNER, D.D., 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*, 360(8), pp. 765-773