



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Función de IDH2 en la diferenciación, proliferación y supervivencia de neuroblastomas con MYCN amplificado

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Pitarch Sanz, Alberto

Tutor/a: Gadea Vacas, José

Cotutor/a externo: FONT DE MORA SAINZ, JAIME

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## ***FUNCIÓN DE IDH2 EN LA DIFERENCIACIÓN, PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE NEUROBLASTOMAS CON MYCN AMPLIFICADO***

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

**ALUMNO:** Alberto Pitarch Sanz

**TUTOR UPV:** José Gadea Vacas

**TUTOR IIS LA FE:** Jaime Font de Mora Sainz

*Curso Académico: 2021-2022*

**VALENCIA, JUNIO 2022**

## RESUMEN

El neuroblastoma (NB) es el segundo tumor sólido más común en niños en Europa y Estados Unidos, representando del 8 al 10% de los cánceres infantiles, superado solo por los tumores del sistema nervioso central. El NB se clasifica en cuatro categorías: riesgo muy bajo, riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto. Actualmente, para mejorar el pronóstico de los casos de alto riesgo, después de altas dosis de quimioterapia y radioterapia, los pacientes se tratan con el agente diferenciador ácido 13-cis-retinoico (AR) combinado con inmunoterapia. Desgraciadamente, la tasa de supervivencia a los 5 años se sigue manteniendo por debajo del 50%. Por ello, es necesario desarrollar terapias más efectivas que aumenten la supervivencia a largo plazo de los pacientes con este subtipo de NB.

Numerosos estudios han demostrado la capacidad del AR de inducir la diferenciación neural en ciertas líneas de NB. Sin embargo, hay tumores que, bien por tener amplificación de MYCN, bien por tener otras alteraciones que también les confieren características de célula madre, poseen mayor resistencia a los tratamientos y, por tanto, mayor probabilidad de recaída. La identificación de los mecanismos que les confieren mayor resistencia al tratamiento podría identificar nuevas dianas terapéuticas para tratamientos más eficaces.

Las mutaciones somáticas de ganancia de función en isocitrato deshidrogenasas (IDH) 1 y 2 se encuentran en múltiples tumores hematológicos y sólidos, lo que lleva a la acumulación del oncometabolito (R)-2-hidroxiglutarato (2HG). 2HG inhibe competitivamente las dioxigenasas dependientes de  $\alpha$ -cetoglutarato causando una desregulación epigenética que pudiera estar implicada en el bloqueo de la diferenciación celular. AG-221 es un inhibidor potente de la enzima IDH2 mutada, que suprime la producción de 2HG e induce diferenciación tanto en células procedentes de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), como en blastos malignos. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado la asociación entre la sobreexpresión de MYCN y IDH2 en varias cohortes de pacientes. Nuestra hipótesis de trabajo es que la producción de 2HG debida a la sobreexpresión de IDH2, es un importante inhibidor de la diferenciación celular inducida por AR. Por tanto, el tratamiento concomitante de AR y de AG-221 podría ayudar a reprogramar el proceso de diferenciación neural, mejorar la eficacia del tratamiento y aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes con NB de alto riesgo.

El objetivo fundamental de este TFM es elucidar la función de la sobreexpresión de IDH2 en el proceso de diferenciación neuronal inducida por AR. Para ello, las tareas a realizar son: 1) estudiar la proliferación y supervivencia celulares (XTT) en las líneas de NB con y sin MYCN amplificado, SK-N-BE(2) y SH-SY5Y, tras inducir la diferenciación con AR, y en presencia o ausencia del inhibidor de la producción de 2HG, AG-221, 2) cuantificar el grado de diferenciación celular, tanto en morfología de neuritogénesis como en la expresión de genes específicos de neurona, en células tratadas con AR y/o con AG-221, y 3) determinar la expresión de marcadores de célula madre en ensayos de inmunofluorescencia y de inmunotransferencia en células tratadas con AR y/o con AG-221.

**PALABRAS CLAVE:** Neuroblastoma, alto riesgo, diferenciación.

## **ABSTRACT**

Neuroblastoma (NB) is the second most common solid tumor in children in Europe and the United States, accounting for 8-10% of childhood cancers, second only to central nervous system tumors. NB is classified into four categories: very low risk, low risk, intermediate risk and high risk. Currently, to improve the prognosis of high-risk cases, after high-dose of chemotherapy and radiotherapy, patients are treated with immunotherapy and the differentiating agent 13-cis-retinoic acid (RA). Unfortunately, the 5-year survival rate remains below 50%. Therefore, there is a need to develop more effective therapies in order to increase the long-term survival of patients with this subtype of NB.

Many studies have shown that treatment with the optimal concentration of RA on certain NB cell lines induces neural differentiation, thus decreasing the rate of cell proliferation. However, there are tumors that, either because they have MYCN amplification or because they have other alterations that also confer stem cell characteristics, have greater resistance to treatment and, therefore, a higher probability of relapse. The identification of the mechanisms that confer them greater resistance to treatment could identify new therapeutic targets for more effective treatments.

Somatic gain-of-function mutations in isocitrate dehydrogenases (IDH) 1 and 2 are found in multiple hematological and solid tumors, leading to the accumulation of the oncometabolite (R)-2-hydroxyglutarate (2HG). 2HG competitively inhibits  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases causing epigenetic dysregulation that may be involved in blocking cell differentiation. AG-221 is a potent inhibitor of the mutated IDH2 enzyme, was found to suppress the production of the oncometabolite 2HG and induce differentiation in cells from both acute myeloid leukemia (AML) patients and malignant blasts. Previous studies from our laboratory have demonstrated the association between MYCN and IDH2 overexpression in several patient cohorts. Our working hypothesis is that 2HG production due to IDH2 overexpression is an important inhibitor of RA-induced cell differentiation. Therefore, concomitant treatment of RA and AG-221 could help to reprogram the neural differentiation process and thus improve treatment efficacy and increase the survival rate of high-risk NB patients.

The fundamental objective of this TFM is to elucidate the role of IDH2 overexpression in the RA-induced neuronal differentiation process. To this end, the tasks to be performed are: 1) to study cell proliferation and survival (XTT) in NB lines with and without amplified MYCN, SK-N-BE(2) and SH-SY5Y, after inducing differentiation with RA, and in the presence or absence of the 2HG production inhibitor, AG-221, 2) to quantify the degree of cell differentiation, both in neuritogenesis morphology and neuron-specific gene expression, in cells treated with RA and/or AG-221, and 3) determine the expression of stem cell markers in immunofluorescence and immunoblotting assays in cells treated with RA and/or AG-221.

**KEY WORDS:** Neuroblastoma, high risk, Differentiation.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quería agradecer a mis padres todo el apoyo y motivación que me han mostrado desde que nací, y que han hecho posible que este trabajo de fin de máster se realizara. A María, por ser un ejemplo de dedicación, por transmitir día a día esa pasión incondicional por la investigación y por hacerme sentir que en esta vida todo es posible.

En segundo lugar, quería agradecer al Dr. Jaime Font de Mora su confianza por integrarme en su grupo de investigación para realizar este trabajo de fin de máster, por mostrarme un apoyo constante tanto en el ámbito científico como personal, y por siempre mantener esa actitud positiva que transmite a todo el grupo y hace que trabajar no cueste nada. A todo el grupo de laboratorio (Esther, Nuria, Eva y Rebeca) por dar siempre soluciones a cualquier problema que surja en el laboratorio y por enseñarme el verdadero significado de trabajar bien y a gusto.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Cáncer.....	1
2. Neuroblastoma.....	1
2.1 Origen del neuroblastoma .....	1
2.2 Tipos de neuroblastoma.....	2
2.3 Estadificación del neuroblastoma .....	2
2.4 Marcadores de pronóstico de neuroblastoma.....	3
3. IDH2 en cáncer .....	4
3.1 IDH2 en neuroblastoma .....	4
4. Terapias actuales en neuroblastoma .....	4
4.1 Terapia actual para pacientes de riesgo bajo o muy bajo.....	4
4.2 Terapia actual para pacientes de riesgo intermedio.....	4
4.3 Terapia actual para pacientes de riesgo alto .....	4
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	6
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	10
1. Ensayo de proliferación.....	10
1.1 Tratamiento con ácido retinoico.....	10
1.2 Tratamiento con AG-221 .....	11
1.3 Tratamiento con ácido retinoico y/o AG-221.....	12
2. Cuantificación de la neuritogénesis .....	13
2.1 Tratamiento con ácido retinoico.....	13
2.2 Tratamiento con AG-221 .....	14
2.3 Tratamiento con ácido retinoico y/o AG-221.....	15
3. Análisis de expresión de Nestina.....	16
3.1 Tratamiento con ácido retinoico o AG-221 .....	16
3.2 Tratamiento con ácido retinoico y/o AG-221.....	17
4. Expresión y localización de marcadores de diferenciación.....	17
<b>CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras tratar con ácido retinoico (10µM, 20µM y 30µM). Las barras corresponden a las medias de 3 replicados ± error estándar. AR: Ácido retinoico. SH: SH-SY5Y. SK: SK-N-BE(2).....	10
<b>Figura 2.</b> Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras tratar con AG-221 (15µM, 30µM y 50µM). Las barras corresponden a las medias de 3 replicados ± error estándar. AG: AG-221. SH: SH-SY5Y. SK: SK-N-BE(2).....	11
<b>Figura 3.</b> Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras tratar con AG-221 y/o ácido retinoico. Las barras corresponden a las medias de 3 replicados ± error estándar. AG: AG-221. AR: ácido retinoico. SH: SH-SY5Y. SK: SK-N-BE(2). ....	12
<b>Figura 4.</b> Imágenes representativas de las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con ácido retinoico (10µM, 20µM y 30µM) <b>(A, C)</b> con sus correspondientes gráficas de cuantificación de neuritogénesis <b>(B, D)</b> . La escala señalada en las imágenes es de 100µm. En las gráficas, las barras corresponden a las medias de 3 replicados ± error estándar. Se ha seguido el estudio GP (GraphPad) para el p valor, siendo *p=0,03; **p=0,0021, ***p=0,0002 y ****p=0,0001. AR: Ácido retinoico. ....	13
<b>Figura 5.</b> Imágenes representativas de las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con AG-221 (15µM, 30µM y 50µM) <b>(A, C)</b> con sus correspondientes gráficas de cuantificación de neuritogénesis <b>(B, D)</b> . La escala señalada en las imágenes es de 100µm. En las gráficas, las barras corresponden a las medias de 3 replicados ± error estándar. Se ha seguido el estudio GP (GraphPad) para el p valor, siendo *p=0,03; **p=0,0021, ***p=0,0002 y ****p=0,0001. ns: no significativo. ....	14
<b>Figura 6.</b> Imágenes representativas de las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con AG-221 (15µM) y/o ácido retinoico (20µM) <b>(A, C)</b> con sus correspondientes gráficas de cuantificación de neuritogénesis <b>(B, D)</b> . La escala señalada en las imágenes es de 100µm. En las gráficas, las barras corresponden a las medias de 3 replicados ± error estándar. Se ha seguido el estudio GP (GraphPad) para el p valor, siendo *p=0,03; **p=0,0021, ***p=0,0002 y ****p=0,0001. ns: no significativo. AR: ácido retinoico. ....	15
<b>Figura 7.</b> Análisis de expresión de nestina en las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con ácido retinoico (10µM, 20µM y 30µM) o AG-211 (15µM y 30µM).....	16
<b>Figura 8.</b> Análisis de expresión de nestina en las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con ácido retinoico (20µM) y/o AG-211 (15µM).....	17
<b>Figura 9.</b> Ensayo de Inmunofluorescencia en la línea celular SH-SY5Y tratada con ácido retinoico y/o AG-221. ....	18
<b>Figura 10.</b> Ensayo de Inmunofluorescencia en la línea celular SK-N-BE(2) tratada con ácido retinoico y/o AG-221.....	19

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estratificación del riesgo en neuroblastoma basada en el porcentaje de supervivencia ausente de eventos de recaída a los 5 años (SLE 5a).....	3
<b>Tabla 2.</b> Representación de los tratamientos empleados en el ensayo de proliferación XTT.....	8

# INTRODUCCIÓN

## 1. Cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel global. El cáncer es un conjunto de más de 200 enfermedades, muy heterogéneas en etiología y pronóstico. Los 5 tipos de cáncer con más incidencia a nivel global son el de mama (11,7% de los casos totales), pulmón (11,4%), colorrectal (10%), próstata (7,3%) y estómago (5,6%) (Sung *et al.*, 2021). Los cánceres con una baja incidencia, también considerados como enfermedades raras, hasta hace poco recibían menor atención, pero actualmente están siendo el foco principal en numerosos centros de investigación.

## 2. Neuroblastoma

El neuroblastoma forma parte de esta categoría siendo el tumor sólido extracraneal más común en infantes, y representando el 8-10% de los cánceres pediátricos en Estados Unidos y Europa (Borriello *et al.*, 2016). Su tasa de mortalidad a nivel global es de 0,85-1,1 casos por cada 100.000 infantes menores a 15 años y la tasa de supervivencia a largo plazo es de solo un 15% (Kholodenko *et al.*, 2018). El neuroblastoma puede presentarse de forma locoregional o bien de forma metastásica, teniendo diversidad de comportamientos biológicos y presentaciones clínicas. Está considerado como una enfermedad heterogénea compleja en la cual factores, como la edad al diagnóstico y el estadiaje de la enfermedad, y múltiples características moleculares, celulares y genéticas del tumor tienen un papel muy importante a la hora de determinar si una terapia puede ser válida o no para un paciente. En los últimos años se ha desarrollado un sistema de clasificación según el riesgo, pero se precisa de más investigación celular y molecular para tener un mayor conocimiento sobre las células precursoras que originan la enfermedad (Cheung & Dyer, 2013).

### 2.1 Origen del neuroblastoma

La mayoría de los neuroblastomas se diagnostican en el abdomen y están asociados con la glándula adrenal y a lo largo del sistema nervioso simpático. Está clasificado como un tumor neuroendocrino embrionario que tiene como origen el linaje simpaticoadrenal de la cresta neural durante el desarrollo. La cresta neural es una estructura que está solamente presente durante la embriogénesis y da lugar a neuronas y células gliales del sistema nervioso simpático, parasimpático y sensorial, a células productoras de epinefrina de la glándula adrenal, a melanocitos, células de Schwann y células del esqueleto craneofacial (Gilbert, 2000). Las células que surgen a partir de la médula adrenal son neuronas postgangliónicas que interactúan con las neuronas pregangliónicas del sistema nervioso central para estimular la liberación de catecolaminas. De esta manera, la médula adrenal actúa como ganglio del sistema nervioso simpático y es el sitio más frecuente al diagnóstico en la mayoría de neuroblastomas. Existe una minoría de pacientes que presenta un neuroblastoma adrenal bilateral causado bien por dos lesiones genéticas individuales en las células del linaje simpaticoadrenal izquierdo y derecho, o bien por una lesión temprana durante el desarrollo que genera una migración bilateral de células precursoras tumorales desde la cresta neural (Cheung & Dyer, 2013).



## 2.2 Tipos de neuroblastoma

### 2.2.1 *Neuroblastoma congénito*

El neuroblastoma congénito está considerado como raro, ya que engloba menos del 2% de todos los neuroblastomas. Las mutaciones en algunas vías de señalización importantes para el desarrollo del linaje simpaticoadrenal están asociadas con síndromes genéticos congénitos caracterizados por una predisposición a generar neuroblastoma. La primera mutación que se identificó en neuroblastomas congénitos fue en el gen *PHOX2B*. Este gen codifica a un factor de transcripción que promueve la diferenciación neuronal y tiene un efecto crucial en el desarrollo de neuronas derivadas de la cresta neural (Borriello *et al.*, 2016). Mutaciones con pérdida de función en *PHOX2B* disrumen la vía de diferenciación en el linaje simpaticoadrenal de la cresta neural, son causantes del síndrome de Hirschprung y pueden facilitar el desarrollo de neuroblastoma (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008).

La mutación más común en neuroblastomas congénitos está en el gen *ALK* (linfoma quinasa anaplásico) y es de ganancia de función. Este gen está expresado en el desarrollo del linaje simpaticoadrenal de la cresta neural, y regula la proliferación y diferenciación de las células a través de varias vías de señalización. Además, se ha visto como el gen *PHOX2B* regula directamente la expresión de *ALK*, existiendo una conexión entre ambas mutaciones en este tipo de neuroblastoma (Bachetti *et al.*, 2010).

### 2.2.2 *Neuroblastoma esporádico*

El neuroblastoma esporádico, a diferencia del congénito, se genera en pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad. Sobre un 8% de este tipo de neuroblastoma contiene mutaciones somáticas en *ALK* y sobre un 2% tiene una alta frecuencia de la amplificación del gen *ALK* (Mossé *et al.*, 2008). Una lesión común en neuroblastomas esporádicos es la amplificación de *MYCN*, presente en el 22% de los tumores. Esta proteína regula el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células implicadas en el desarrollo del sistema nervioso central, y al estar amplificada actúa como conductor oncogénico, asociándose a un mal pronóstico de la enfermedad (Grimmer & Weiss, 2006). Además, en el neuroblastoma esporádico también se encuentran de manera frecuente mutaciones en el síndrome de alfa-talasemia/retraso mental ligado al cromosoma X (*ATRX*). Mutaciones en *ATRX* no promueven la generación del tumor por si solas, pero existe una asociación significativa entre estas mutaciones y la edad del paciente al diagnóstico. Los pacientes menores de 18 meses de edad no presentan mutaciones en *ATRX* y tienen un buen pronóstico de la enfermedad, mientras que pacientes mayores de 18 meses sí que las presentan y tienen un peor pronóstico. Además, este tipo de mutaciones no han sido identificadas en tumores con *MYCN* amplificado (Cheung *et al.*, 2012).

## 2.3 Estadificación del neuroblastoma

El neuroblastoma presenta genéticas muy variadas con comportamientos dispares, requiriendo de tratamientos variados que dependen de cada subtipo de neuroblastoma. Por ello, el grupo internacional de neuroblastoma (INRG) recientemente ha actualizado la estadificación de los neuroblastomas en grupos de riesgo, con el objetivo de ajustar las terapias de los pacientes (Cohn *et al.*, 2009). El sistema actual de clasificación por INRG estadía los neuroblastomas en localizados (L1, L2) y metastásicos (M y Ms):

- **L1:** El tumor está localizado y no afecta a estructuras vitales. No presenta factores de riesgo definidos por imagen (FRDIs).

- **L2:** El tumor está localizado de forma locoregional con uno o más FRDIs. Si no son ipsilaterales o si son discontinuos se considera ya metastásico.
- **M:** Presencia de metástasis a distancia. Los ganglios cercanos al tumor se consideran metastásicos.
- **MS:** Infante menor de 18 meses con metástasis en piel, hígado y/o médula ósea. El tumor primario puede tener un estadio L1 o L2. Limitación de menos del 10% de infiltración en la médula ósea.

Además, el INRG también ha realizado una clasificación de subgrupos de riesgo con el objetivo de representar una estratificación del riesgo en neuroblastoma antes del tratamiento. Para ello, se han tenido en cuenta factores como la edad del paciente, estadio del tumor, histología del tumor, amplificación de *MYCN*, aberraciones citogenéticas en 11q, grado de diferenciación, y ploidía del ADN (Mahapatra & Challagundla, 2022). Se desarrollaron 4 subgrupos pronóstico basados en la supervivencia sin eventos de recaída a los 5 años (SLE 5a) (**Tabla 1**).

Riesgo	SLE 5a
<b>Muy bajo</b>	> 85%
<b>Bajo</b>	75% - 85%
<b>Intermedio</b>	50% - 75%
<b>Alto</b>	< 50%

**Tabla 1.** Estratificación del riesgo en neuroblastoma basada en el porcentaje de supervivencia ausente de eventos de recaída a los 5 años (SLE 5a).

#### 2.4 Marcadores de pronóstico de neuroblastoma

Los marcadores de pronóstico junto con la estadificación del tumor ayudan a categorizar los grupos de riesgo en neuroblastoma. Estos marcadores son muy variados y ayudan a predecir si el pronóstico del paciente será bueno o malo, dependiendo del perfil que tenga (Parodi *et al.*, 2011) Los más representativos son:

- **Edad:** La edad del paciente al diagnóstico por debajo de 18 meses es de mejor pronóstico que pacientes de mayor edad.
- **Histología del tumor:** Si el tejido procedente del neuroblastoma de un paciente es irregular (histología no favorable) y contiene células con aspecto anormal se le atribuye un peor pronóstico (Joshi & Tsongalis, 1997).
- **Amplificación del gen *MYCN*:** La amplificación de *MYCN* es de por sí de alto riesgo, independientemente de la edad o de otros factores de riesgo.
- **Receptores de neurotrofina:** Las neurotrofinas ayudan a madurar a las células nerviosas, por lo que los neuroblastomas que tengan más cantidad de ciertos receptores de neurotrofina, como el receptor del factor de crecimiento nervioso TrKA, tendrán un mejor pronóstico (Eggert *et al.*, 2000).
- **Cambios cromosómicos:** Células tumorales que tienen alteraciones cromosómicas como la delección de 11q, la delección de 1p o la ganancia de 17q pueden asociarse a un mal pronóstico.

El estudio de los marcadores de pronóstico ayuda a identificar pacientes con neuroblastomas localizados y resecables con riesgo de progresión y/o recaída, que pueden beneficiarse de un tratamiento temprano y más agresivo.

### 3. IDH2 en cáncer

La familia IDH consta de 3 isoenzimas (IDH1, IDH2 e IDH3) que convierten isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) vía descarboxilación oxidativa. Este metabolito forma parte del ciclo de Krebs y actúa como donante de energía, molécula de señalización, productor de aminoácidos y regulador de procesos epigenéticos (Dang *et al.*, 2016). Las mutaciones somáticas de ganancia de función en isocitrato deshidrogenasas, como en *IDH2*, se encuentran en múltiples tumores hematológicos y sólidos, como los gliomas o enfermedades mieloides malignas, y causan la acumulación del oncometabolito (R)-2-hidroxiglutarato (2HG). 2HG inhibe competitivamente las dioxigenasas dependientes de  $\alpha$ -cetoglutarato, incluyendo histonas desmetilasas y metilcitosina dioxigenasas de la familia TET, causando una desregulación epigenética notable en todo el genoma de la célula cancerosa que pudiera estar implicada en el bloqueo de la diferenciación celular (Ježek, 2020).

#### 3.1 IDH2 en neuroblastoma

Nuestro grupo realizó estudios *in silico* preliminares con diversas cohortes de pacientes con neuroblastoma que revelaron una correlación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de MYCN e IDH2, y es que múltiples regulaciones epigenéticas donde actúa MYCN, tienen como denominador común la sobreactivación de IDH2 y la producción de 2HG.

Recientemente se está probando un inhibidor de IDH2, AG-221, en adultos con leucemia mieloide aguda (LMA) y está dando unos resultados sin precedentes que se podrían trasladar a pacientes con neuroblastoma. Por ello, en este estudio, se va a evaluar el efecto de este inhibidor de IDH2 (AG-221) junto con el tratamiento ya existente de AR (Abe *et al.*, 2005).

### 4. Terapias actuales en neuroblastoma

Las estrategias terapéuticas en neuroblastoma han ido evolucionando de forma considerable, y actualmente se deciden a partir de los estudios diagnósticos y de la clasificación de riesgo.

#### 4.1 Terapia actual para pacientes de riesgo bajo o muy bajo

El paciente puede no recibir tratamiento y se observa la regresión espontánea del tumor mediante estudios de imagen y marcadores específicos. En el caso que progrese la enfermedad, se realiza un estudio del paciente y se trata con cirugía y/o quimioterapia (De Bernardi *et al.*, 2008).

#### 4.2 Terapia actual para pacientes de riesgo intermedio

En este grupo de pacientes hay mucha heterogeneidad y los tratamientos suelen variar, pero generalmente se trata con una clásica quimioterapia seguida de la cirugía del tumor. Si el tumor presenta una histología desfavorable, se consolida la terapia con más quimioterapia y radioterapia local (Baker *et al.*, 2010).

#### 4.3 Terapia actual para pacientes de riesgo alto

Al ser el grupo de pacientes con más riesgo, la terapia es más rigurosa y extensa. La terapia consta de 3 fases: inducción, consolidación y post-consolidación. En la fase de inducción se suministra quimioterapia y se realiza la resección del tumor. En la fase de consolidación se suministra una quimioterapia mieloablativa, se realiza un autotransplante de células madre

hematopoyéticas y seguidamente se aplica radioterapia. Finalmente, en la fase de post-consolidación se aplica inmunoterapia con anticuerpos anti-GD2 (dinutuximab) junto con ácido 13-cis-retinoico (AR) para tratar la enfermedad mínima residual (Matthay *et al.*, 1999). El AR es uno de los inductores de diferenciación de neuroblastomas *in vitro* más potentes, que está siendo empleado en clínica (Reynolds *et al.*, 2003).

Gracias al desarrollo de nuevas terapias como la inmunoterapia y el suministro de AR, la supervivencia de los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo ha aumentado. Esto se debe a la gran eficacia de estos fármacos en prevenir la recaída, pero a pesar de estos avances, la supervivencia a los 5 años en el alto riesgo oscila en torno al 50% y, en caso de que el paciente recaiga, la supervivencia baja por debajo del 10%. Por ello, es muy importante investigar las bases genéticas y moleculares de la enfermedad para poder tener un mayor conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a los tratamientos y poder optimizarlos.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo es que la producción de 2HG debida a la sobreexpresión de IDH2, es un importante inhibidor de la diferenciación celular inducida por AR. Por tanto, el tratamiento concomitante de AR y de AG-221 podría ayudar a reprogramar el proceso de diferenciación neural y, de esta manera, mejorar la eficacia del tratamiento y aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes con NB de alto riesgo.

El objetivo fundamental de este TFM es elucidar la función de la sobreexpresión de IDH2 en el proceso de diferenciación neuronal inducida por AR. Para ello, las tareas a realizar son:

- 1) estudiar la proliferación y supervivencia celulares (XTT) en las líneas de NB con y sin *MYCN* amplificado, SK-N-BE(2) y SH-SY5Y, tras inducir la diferenciación con AR, y en presencia o ausencia del inhibidor de la producción de 2HG, AG-221.
- 2) cuantificar el grado de diferenciación celular, tanto en morfología de neuritogénesis como en la expresión de genes específicos de neurona, en células tratadas con AR y/o con AG-221.
- 3) determinar la expresión de marcadores de célula madre en ensayos de inmunofluorescencia y de inmunotransferencia en células tratadas con AR y/o con AG-221.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular

Las líneas celulares SK-N-BE(2) y SH-SY5Y se mantuvieron creciendo en fase exponencial en el medio de cultivo DMEM (Gibco, Thermo Fisher) suplementado con 10% de suero bovino (FBS, Sigma-Aldrich) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, Lonza Bioscience). Las líneas se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. AR y AG-221 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y estas soluciones, guardadas a -20°C hasta el momento de su uso, se añadieron sobre las células de manera que la proporción del DMSO no fuera nunca superior al 1.5% (v/v). A los cultivos control se les añadió el mismo volumen de DMSO sin fármaco.

SK-N-BE(2) es una línea celular de neuroblastoma que se estableció en 1972 a partir de una biopsia de médula ósea de un paciente de 2 años con neuroblastoma diseminado, después de repetidas sesiones de quimioterapia y radioterapia. Tiene la característica de tener *MYCN* amplificado. La línea celular SH-SY5Y es una línea clonada tres veces de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH, que se estableció en 1970 a partir de un tumor óseo metastásico de un paciente de 4 años. No tiene *MYCN* amplificado.

### Extracción y cuantificación proteica

Para realizar la extracción proteica en las células se empleó el siguiente tampón de lisis: Tris-HCl 20mM, NaCl 300mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, EGTA 1mM, β-glicerolfosfato 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1M y Tritón X100 1%, pH 7.5, suplementado con inhibidores de proteasas (Roche) y AEBSF 1 mM (Roche). Para cuantificar la proteína se utilizó el método de BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Inmunodetección mediante transferencia

Las muestras de proteína (40 µg) se separaron en un gel SDS-PAGE al 7%. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Hybond-P, Amersham Life Sciences) durante la noche a 4°C. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con el tampón TBST (solución salina tamponada con Tris, 0.1% Tween 20) con 5% leche en polvo durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (α-Nestin 1:500, Santa Cruz) durante la noche a 4°C.

Las membranas fueron lavadas 5 veces durante 5 minutos con tampón TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario (α-mouse 1:10000, Thermo Fisher Scientific) conjugado con peroxidasa de rábano correspondientes (IgG peroxidasa 1:1000 Sigma-Aldrich) durante 1 hora a T ambiente. Las bandas se visualizaron usando el Kit de detección de quimioluminiscencia ECL (Thermo Fisher Scientific) mediante Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences). Se utilizó α-β-actina como control de carga.

### Ensayo de proliferación XTT

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 7000 células/pocillo para la línea celular SK-N-BE(2) y de 5000 células/pocillo para la línea celular SH-SY5Y, y se mantuvieron en DMEM + 10% FBS + 1% P/S. Como tratamientos utilizamos ácido 13-cis-retinoico y AG-221 tanto de forma individual como conjuntamente para generar diferentes condiciones (**Tabla 2**). Para cada condición se realizó un triplicado. El ensayo XTT se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen™ CyQUANT™ XTT Cell Viability Assay) midiendo absorbancia en el lector de microplacas (Promega) a 450nm tras 5 horas de incubación con el reactivo a día 0, 2, 3 y 4.

Condición	Tratamiento
-	Control
1	AR 10 $\mu$ M
2	AR 20 $\mu$ M
3	AR 30 $\mu$ M
4	AG 15 $\mu$ M
5	AG 30 $\mu$ M
6	AG 50 $\mu$ M
7	AG 15 $\mu$ M + AR 10 $\mu$ M
8	AG 15 $\mu$ M + AR 20 $\mu$ M

*Tabla 2. Representación de los tratamientos empleados en el ensayo de proliferación XTT.*

### Cuantificación de neuritogénesis

Las células se sembraron en placas de cultivo de 6cm de diámetro a una densidad de 600.000 células por placa tanto para la línea SK-N-BE(2) como para la línea SH-SY5Y. Se mantuvieron en DMEM + 10% FBS + 1% P/S. El mismo día de la siembra se trataron con el AR y/o AG, y al día 3 de tratamiento se realizaron las fotos y la subsiguiente cuantificación de neuritogénesis. Para poder realizar la cuantificación de forma óptima se seleccionaron 3 áreas diferentes en cada placa y se contaron la cantidad de células con neuritas  $\geq 30\mu$ m, en al menos 150 células por área, (software LAS X de Leica). Para realizar las fotos y contar las células se empleó un aumento de 10X en el microscopio invertido (Leica).

### Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales empleados: anti-Oct 4 (7F9.2, Millipore, dilución 1:500), anti-Nestin (BD611658, BD Transductions Laboratory TM, dilución 1:500); anti- $\beta$ -actin (clon ac-15, dilución 1:10.000) y anti-MAP2 (clon HM-2, Sigma-Aldrich, dilución 1:500).

### **Ensayo de inmunofluorescencia**

Se sembraron las células en cubreobjetos y se mantuvieron en DMEM + 10% FBS + 1% P/S. Se trataron los cubres correspondientes con AR y/o AG de forma que obtuviéramos las condiciones pertinentes a estudio. Las células se fijaron con solución de formalina en PBS (tampón fosfato salino) al 10% durante 15 minutos, se permeabilizaron en PBS con Triton-X100 al 0,1% durante 15 minutos, y se bloquearon con suero de caballo al 1% y PBS con BSA (Albúmina de suero bovino) al 3% a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante la noche en una cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos secundarios conjugados a Cy3 y FITC fueron utilizados siguiendo las instrucciones del fabricante. La tinción del núcleo se realizó con DAPI. Las muestras fueron fotografiadas en un microscopio de fluorescencia Leica DM6000.

### **Análisis estadísticos**

En las gráficas, los datos se representaron como media  $\pm$  SEM de 3 replicados experimentales. Se realizaron pruebas t de Student para los estudios con 3 y 2 grupos con el objetivo de ver si la relación era significativa. Se ha seguido el estudio GP (GraphPad) para el p valor, siendo \*p=0,03; \*\*p=0,0021, \*\*\*p=0,0002 y \*\*\*\*p=0,0001.

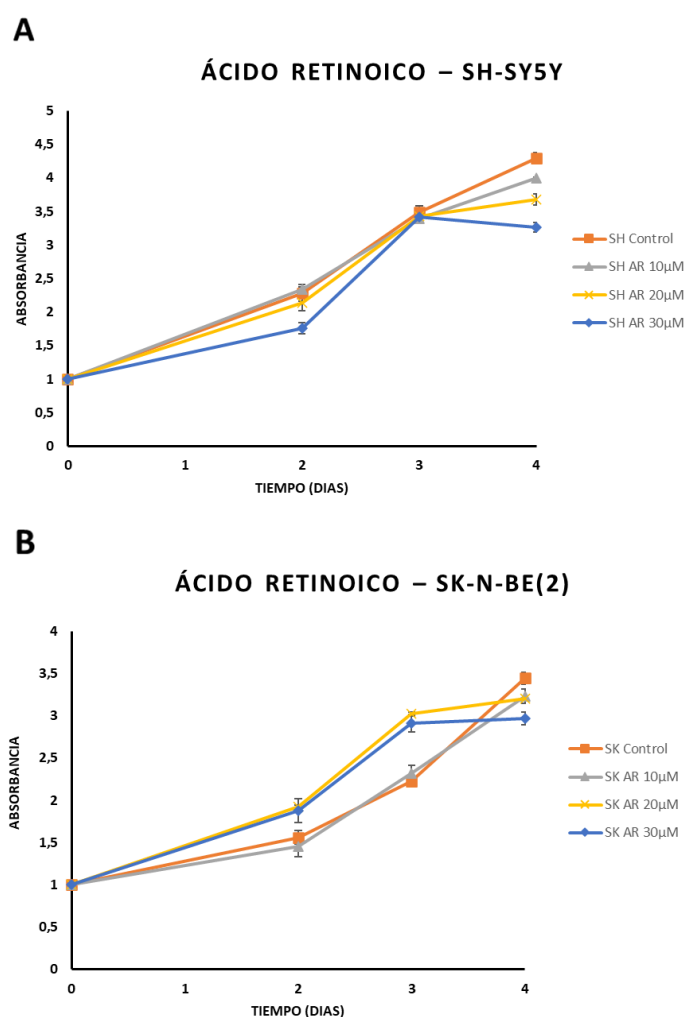


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Ensayo de proliferación

### 1.1 Tratamiento con ácido retinoico

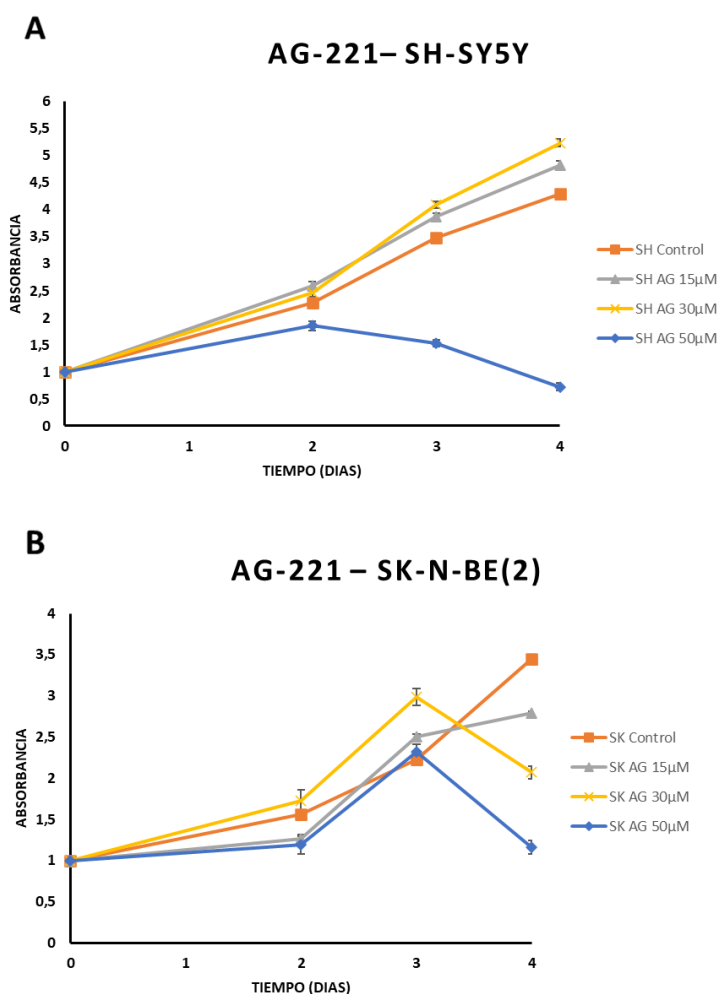
Al aumentar la concentración de ácido retinoico en la línea celular SH-SY5Y, la proliferación celular disminuye notablemente a partir del día 3 respecto al control. Cabe destacar que hay un efecto dosis-dependiente, ya que cuando las células son tratadas con AR 30 $\mu$ M se observa una menor proliferación celular con respecto a las tratadas con AR 10 $\mu$ M. Por lo general, las células cancerosas adquieren modificaciones que les hacen desdiferenciarse volviendo a un estado progenitor temprano con mayor capacidad proliferativa. Al diferenciarse, las células pierden en gran medida su capacidad de proliferar, consistentemente con lo que observamos en células SH-SY5Y tratadas con dosis crecientes de AR (**Figura 1A**). En la línea SK-N-BE(2), las células tratadas con AR tienen una proliferación muy similar a las células control. A días 2 y 3, la proliferación celular de las células tratadas con AR (20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) está en valores más altos que en el control, pero no llegan a ser significativos. A partir del día 3, las células tratadas con AR 20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M dejan de proliferar. Cuando tratamos las células con AR 10 $\mu$ M la tendencia de proliferación celular es muy similar al control (**Figura 1B**).



**Figura 1.** Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras tratar con ácido retinoico (10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M). Las barras corresponden a las medias de 3 replicados  $\pm$  error estándar. AR: Ácido retinoico. SH: SH-SY5Y. SK: SK-N-BE(2).

## 1.2 Tratamiento con AG-221

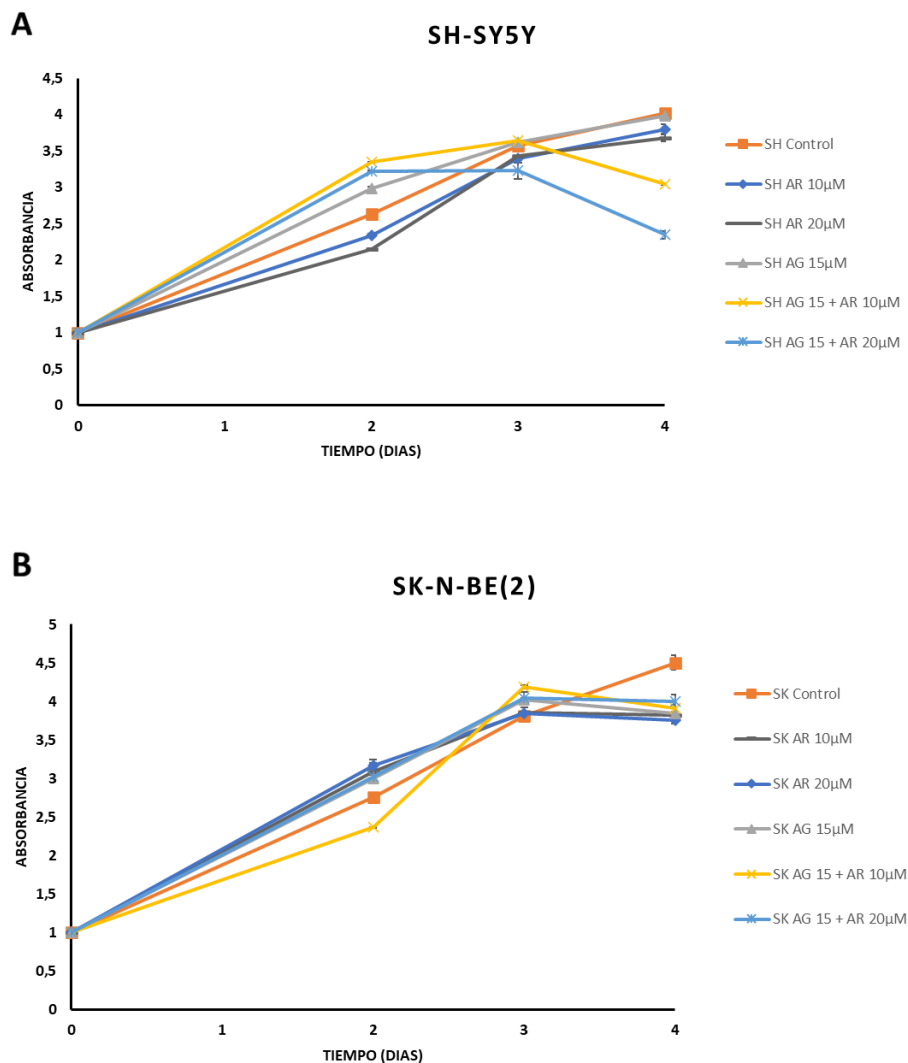
Al tratar la línea celular SH-SY5Y con AG-221 (15 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) hay un moderado aumento de la tasa de proliferación celular respecto al control, mientras que cuando se trata con una concentración de 50 $\mu$ M, se observa una notable disminución de la misma a partir del día 2 (**Figura 2A**). Este resultado sugiere que a las concentraciones bajas de AGI-221 no hay ningún efecto sobre la proliferación, pero a 50 $\mu$ M las células pierden viabilidad celular. Al tratar la línea celular SK-N-BE(2) con AG-221 (15 $\mu$ M), la proliferación disminuye moderadamente respecto al control. Pero al aumentar la concentración de AG-221 (30 $\mu$ M y 50 $\mu$ M) se observa como a partir del día 3 la proliferación disminuye drásticamente (**Figura 2B**). Este resultado indica que el inhibidor AGI-221 tiene un efecto dosis-dependiente en las células SK-N-BE(2) y que muestran mayor sensibilidad al tratamiento que las células SH-SY5Y, inhibiendo la viabilidad celular a concentraciones más bajas.



**Figura 2.** Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras tratar con AG-221 (15 $\mu$ M, 30 $\mu$ M y 50 $\mu$ M). Las barras corresponden a las medias de 3 replicados  $\pm$  error estándar. AG: AG-221. SH: SH-SY5Y. SK: SK-N-BE(2).

### 1.3 Tratamiento con ácido retinoico y/o AG-221

El tratamiento de las células SH-SY5Y con los fármacos individualmente no produce cambios relevantes en la proliferación (compárese las pendientes de las curvas en monoterapia) (**Figura 3A**), pero cuando se crea una combinatoria de estos fármacos se observa un sinergismo que hace que la proliferación disminuya de forma notable con respecto al control (**Figura 3A**). La combinatoria más eficiente consta de las siguientes concentraciones: AG-221 15 $\mu$ M y AR 20 $\mu$ M, reduciendo la proliferación y supervivencia celulares en casi un 50%, e indica que las células puedan estar diferenciándose y/o perdiendo viabilidad de manera más óptima que con los tratamientos con AR (**Figura 3A**). Los tratamientos no tienen un impacto significativo en la proliferación celular de la línea SK-N-BE(2). Se observa como la proliferación celular en todos los tratamientos sigue una tendencia similar, afectándose moderadamente con AGI-221 15 $\mu$ M a partir del día 3, pero sin incrementarse la inhibición al añadir también AR (**Figura 3B**). Es posible que la ausencia de sinergismo de la combinación de fármacos para inhibir la proliferación celular de células SK-N-BE(2) sea debido a la amplificación de *MYCN*. *MYCN* es un factor de transcripción implicado en la supervivencia y mantenimiento de célula madre y forma parte del cóctel de 4 factores de transcripción que reprograman un fibroblasto en célula totipotente (Yamanaka, 2013).

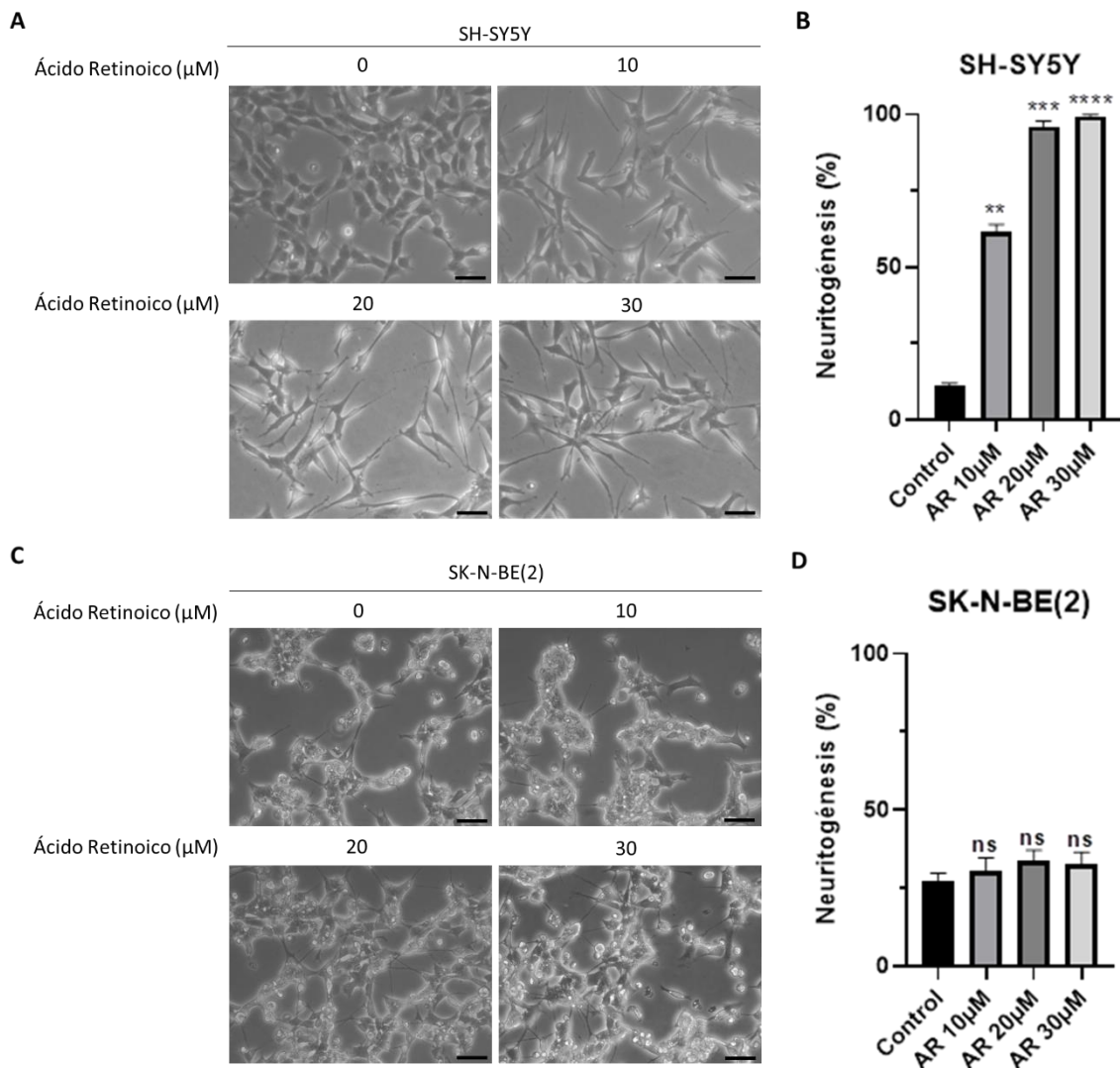


**Figura 3.** Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras tratar con AG-221 y/o ácido retinoico. Las barras corresponden a las medias de 3 replicados  $\pm$  error estándar. AG: AG-221. AR: ácido retinoico. SH: SH-SY5Y. SK: SK-N-BE(2).

## 2. Cuantificación de la neuritogénesis

### 2.1 Tratamiento con ácido retinoico

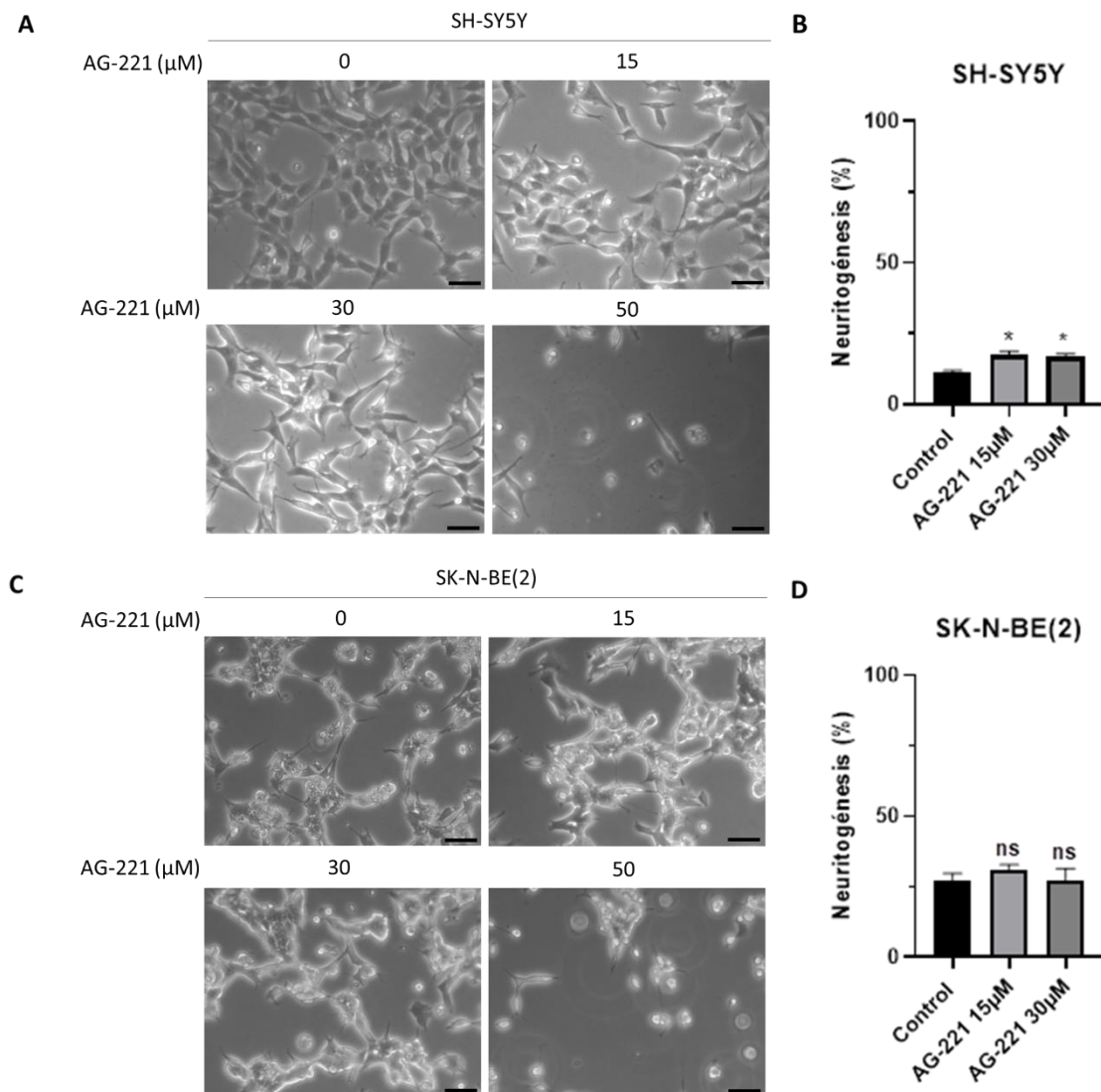
A medida que la concentración de AR incrementa en la línea SH-SY5Y, se van generando neuritas que no observamos en el control. Estos resultados confirman que a día 3 ya se ha producido una diferenciación celular notable (**Figura 4A**). La neuritogénesis de las células tratadas con AR (20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) es realmente significativa ( $p < 0,0002$  y  $p < 0,0001$  respectivamente) respecto al control (**Figura 4B**). Cuando tratamos la línea SK-N-BE(2) con AR no observamos una neuritogénesis significativa en comparación al control. Cuando se trata con AR (20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) se observa un ligero aumento de la longitud de las neuritas ya existentes, pero no se aprecia la generación de nuevas neuritas. La amplificación de *MYCN* en las células SK-N-BE(2) supone un impedimento transcripcional en el proceso de diferenciación celular, explicando la menor eficacia de AR en neuritogénesis que en las células SH-SY5Y (**Figura 4C**). La neuritogénesis de las células tratadas con las 3 concentraciones de AR no es significativa respecto al control (**Figura 4D**).



**Figura 4.** Imágenes representativas de las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con ácido retinoico (10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) (**A, C**) con sus correspondientes gráficas de cuantificación de neuritogénesis (**B, D**). La escala señalada en las imágenes es de 100 $\mu$ m. En las gráficas, las barras corresponden a las medias de 3 replicados  $\pm$  error estándar. Se ha seguido el estudio GP (GraphPad) para el p valor, siendo \* $p=0,03$ ; \*\* $p=0,0021$ , \*\*\* $p=0,0002$  y \*\*\*\* $p=0,0001$ . El estudio estadístico se realiza comparando cada condición con el control. AR: Ácido retinoico.

## 2.2 Tratamiento con AG-221

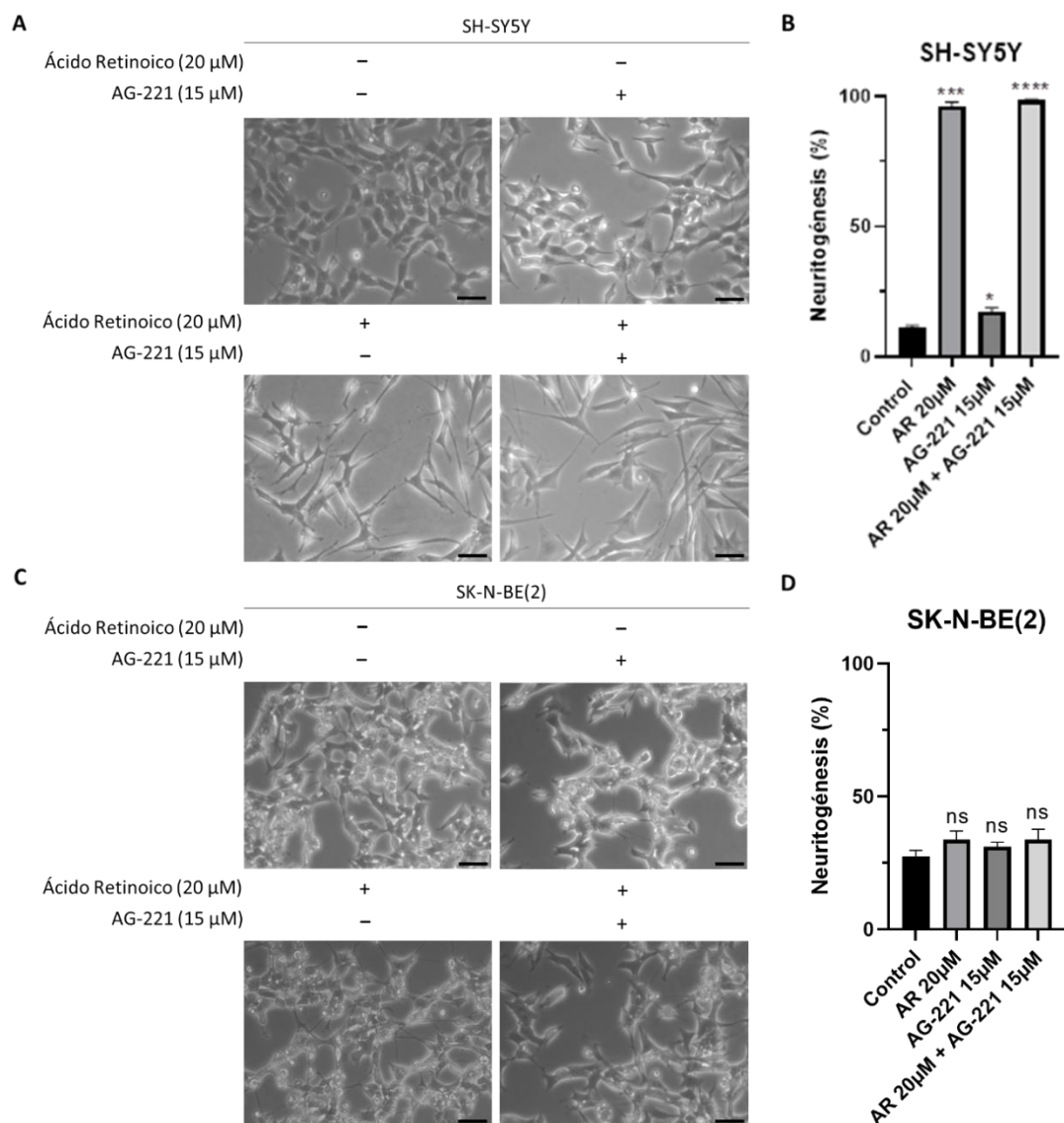
Al tratar la línea SH-SY5Y con AG-221 (15 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) se observa un ligero aumento de la neuritogénesis y un aparente cambio en la morfología celular (**Figura 5A**), pero no comparable al grado de diferenciación promovida por el ácido retinoico, tanto en el número de células afectadas como en la extensión de las neuritas (comparar **Figura 5A,B** y **Figura 5A,B**). A concentración de 50 $\mu$ M las células se mueren y no son valorables para su estudio (**Figura 5A**). En la cuantificación observamos como el tratamiento con el inhibidor es poco significativo con respecto al control (**Figura 5B**). Cuando se trata la línea celular SK-N-BE(2) con AG-221 (15 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) no se observa un cambio morfológico notable con respecto al control. Cuando las células son tratadas con AG-221 (50 $\mu$ M), de igual forma que la línea SH-SY5Y, mueren y no son valorables para su estudio (**Figura 5C**). La neuritogénesis generada tras el tratamiento con concentraciones subletales del inhibidor no es significativa (**Figura 5D**).



**Figura 5.** Imágenes representativas de las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con AG-221 (15 $\mu$ M, 30 $\mu$ M y 50 $\mu$ M) (**A, C**) con sus correspondientes gráficas de cuantificación de neuritogénesis (**B, D**). La escala señalada en las imágenes es de 100 $\mu$ m. En las gráficas, las barras corresponden a las medias de 3 replicados  $\pm$  error estándar. Se ha seguido el estudio GP (GraphPad) para el p valor, siendo \* $p=0,03$ ; \*\* $p=0,0021$ , \*\*\* $p=0,0002$  y \*\*\*\* $p=0,0001$ . El estudio estadístico se realiza comparando cada condición con el control. ns: no significativo.

### 2.3 Tratamiento con ácido retinoico y/o AG-221

A la hora de estudiar el efecto de la combinatoria de fármacos sobre la neuritogénesis, volvimos a repetir como controles los tratamientos en monoterapia. Al tratar la línea SH-SY5Y con AG-221 (15 $\mu$ M) se observa un cambio comedido pero significativos respecto al control; pero al tratar con AR (20 $\mu$ M) se observa una diferenciación notable de las células. Cabe destacar que cuando se combinan ambos tratamientos se genera un ligero aumento de la diferenciación con respecto al tratamiento individual con AR (20 $\mu$ M) y esto da lugar a una menor tasa de proliferación celular durante el tratamiento (**Figura 6A**). En la cuantificación podemos observar cómo se genera un efecto aditivo al combinar ambos tratamientos, ya que el porcentaje de la neuritogénesis celular aumenta hasta el 100%, siendo un valor muy significativo con respecto al control ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 6B**). Actualmente estamos evaluando la posibilidad de sinergismo empleando concentraciones más bajas de AR (5 y 10 $\mu$ M). En la línea SK-N-BE(2) no se observan cambios visuales muy significativos al tratar las células (**Figura 6C**). Los tratamientos no generan un aumento significativo de la neuritogénesis con respecto al control (**Figura 6D**).

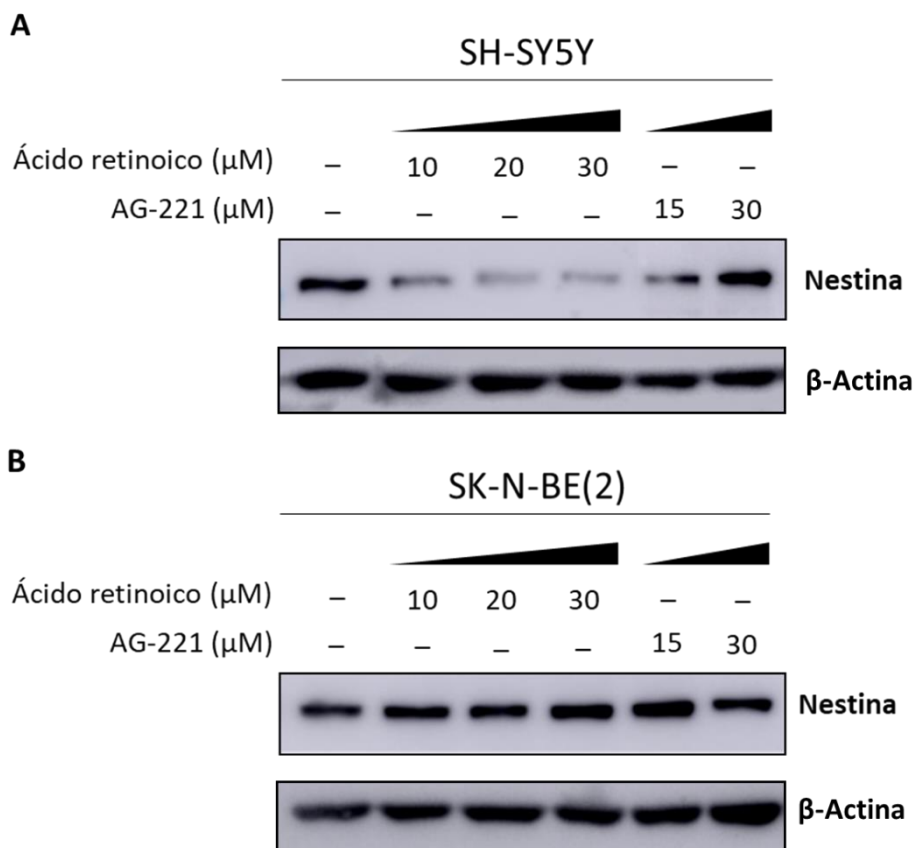


**Figura 6.** Imágenes representativas de las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con AG-221 (15 $\mu$ M) y/o ácido retinoico (20 $\mu$ M) (**A, C**) con sus correspondientes gráficas de cuantificación de neuritogénesis (**B, D**). La escala señalada en las imágenes es de 100 $\mu$ m. En las gráficas, las barras corresponden a las medias de 3 replicados  $\pm$  error estándar. Se ha seguido el estudio GP (GraphPad) para el p valor, siendo \* $p=0,03$ ; \*\* $p=0,0021$ , \*\*\* $p=0,0002$  y \*\*\*\* $p=0,0001$ . El estudio estadístico se realiza comparando cada condición con el control. ns: no significativo. AR: ácido retinoico.

### 3. Análisis de expresión de Nestina.

#### 3.1 Tratamiento con ácido retinoico o AG-221

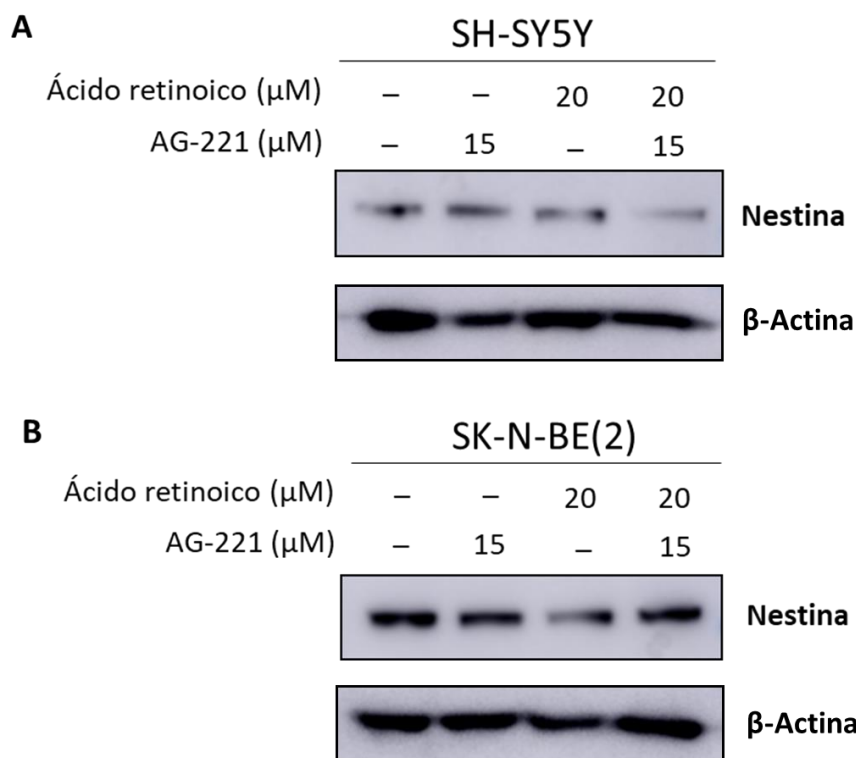
La pérdida en la expresión de nestina se usa habitualmente como medida de la diferenciación neuronal. Cuando se trata la línea SH-SY5Y con AR (20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) se observa una significativa disminución de expresión de nestina respecto al control. Esto indica que las células se diferencian eficientemente y, por lo tanto, van dejando de tener propiedades de célula troncal neuronal, coincidiendo con el aumento de neuritogénesis observada en la **Figura 6**. Cuando las células son tratadas con AG-221 (15 $\mu$ M) se observa una cierta reducción de la expresión de nestina, que es muy poco aparente en el tratamiento con AG-221 (30 $\mu$ M) (**Figura 7A**), coincidiendo con la pobre inducción de neuritogénesis observada en la **Figura 7A,B**. En la línea SK-N-BE(2) se observa prácticamente el mismo grado de expresión de nestina tanto en el control como en el resto de tratamientos. Este resultado sugiere que las células son resistentes a la diferenciación inducida por AR (**Figura 7B**), coincidiendo con los resultados de neuritogénesis de la **Figura 7C,D**. El tratamiento con AGI-221 no muestra el efecto anti-proliferativo/supervivencia observado en la **Figura 72B** probablemente debido a que la caída en la supervivencia celular se observa en el cuarto día, pero las células para inmunotransferencia se recogieron en el tercer día de tratamiento, antes de que el efecto de supervivencia se manifieste.



**Figura 7.** Análisis de expresión de nestina en las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con ácido retinoico (10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) o AG-221 (15 $\mu$ M y 30 $\mu$ M).

### 3.2 Tratamiento con ácido retinoico y/o AG-221

Al tratar la línea SH-SY5Y con AR (20 $\mu$ M), la expresión de nestina disminuye levemente, mientras que el doble tratamiento con la combinación de ambos fármacos resulta en una disminución de la expresión de nestina (comparar tercera y cuarta calle de la **Figura 8**. Análisis de expresión de nestina en las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con ácido retinoico (20 $\mu$ M) y/o AG-221 (15 $\mu$ M). Esto sugiere que pudiera haber un sinergismo en la inducción de diferenciación celular al combinar ambos fármacos. En la línea SK-N-BE(2) se observa una menor expresión de nestina al tratar con AR (20 $\mu$ M), pero no con la combinatoria de fármacos. Esto puede deberse a una menor carga de proteína en el gel (nótese la menor cantidad de  $\beta$  actina en el correspondiente panel inferior, **Figura 8B**). Estos resultados estarían de acuerdo con la ausencia de diferenciación celular que observamos en el estudio de neuritogénesis de la **Figura 6C,D**.



**Figura 8.** Análisis de expresión de nestina en las líneas SH-SY5Y y SK-N-BE(2) tras ser tratadas con ácido retinoico (20 $\mu$ M) y/o AG-221 (15 $\mu$ M).

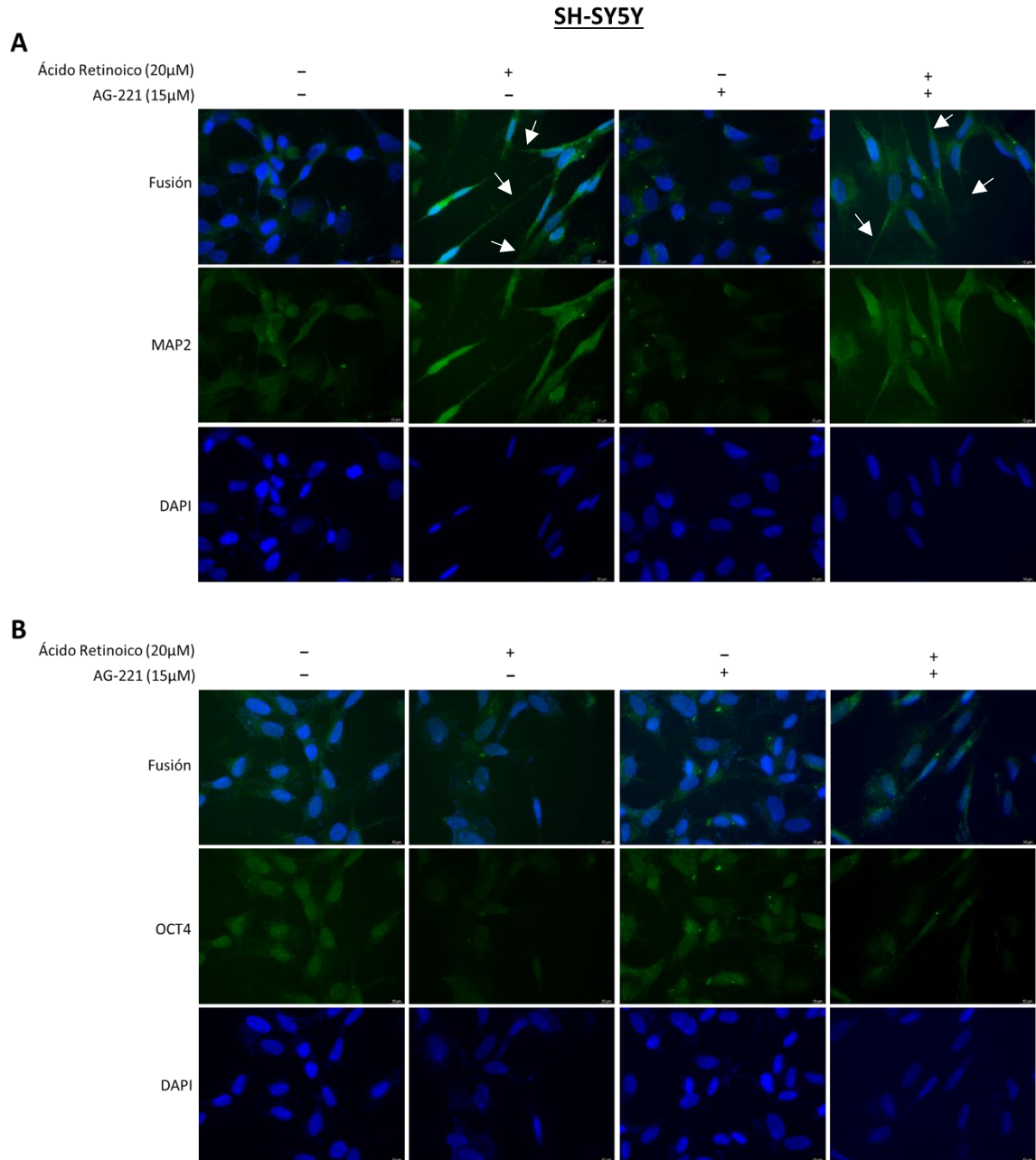
### 4. Expresión y localización de marcadores de diferenciación.

En este ensayo se estudió la expresión de MAP2, una proteína que forma el citoesqueleto celular de neuronas diferenciadas, y la expresión de Oct4, un factor de transcripción implicado en la reprogramación celular y en el mantenimiento de las características de célula madre.

La línea SH-SY5Y control junto con las tratadas con AG-221 presentan una baja expresión de MAP2, mientras que las tratadas con AR y la combinación de AR con AG-221 presentan una alta expresión en el citoplasma y a lo largo de las neuritas generadas (**Figura 9A**). Al observar la expresión de Oct4 en las mismas condiciones, observamos una expresión inversa a MAP2, con mayor expresión en las células control y en las tratadas con AG-221 que en las tratadas con AR o con la combinación de AR y AG-221 (**Figura 9B**).

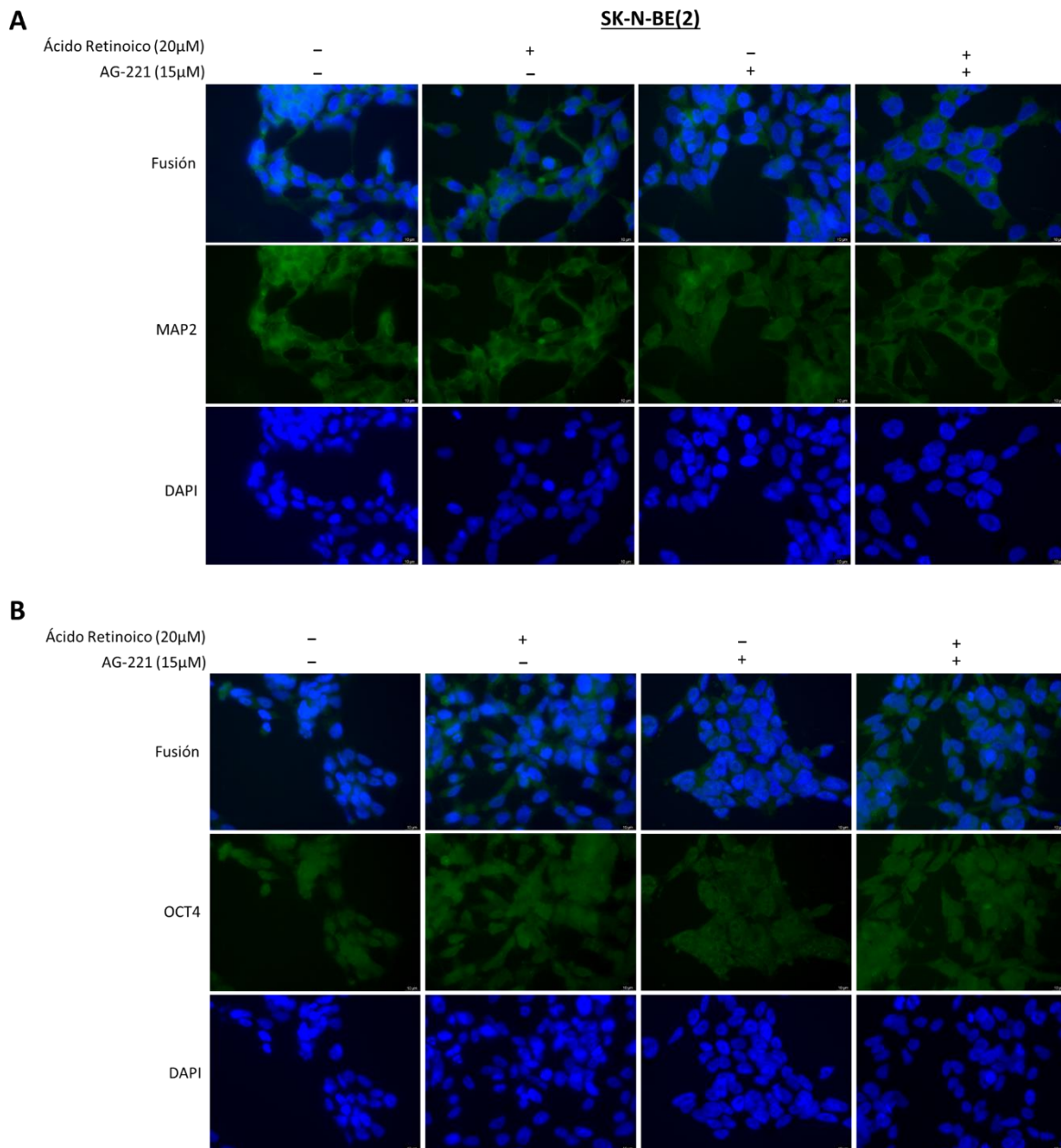


La alta expresión de MAP2 y la baja expresión de Oct4 confirman que las células tratadas con AR y con la combinación de AR y AG-221 se diferencian de manera exitosa. Si comparamos estos dos tratamientos no se observa una diferencia muy significativa en cuanto a niveles de expresión de ambas proteínas, pero sí que se observa una mayor neuritogénesis en las células tratadas con la combinación de ambos fármacos.



**Figura 9.** Ensayo de Inmunofluorescencia en la línea celular SH-SY5Y tratada con ácido retinoico y/o AG-221.

En la línea celular SK-N-BE(2) los tratamientos no tuvieron cambios aparentes en la expresión de MAP2 ni de OCT4, manteniéndose estables con los distintos tratamientos (**Figura 10A/B**). Este resultado apoya a que los tratamientos no promueven la diferenciación neuronal en células SK-N-BE(2), confirmando la ausencia de neuritogénesis cuantificada en la de la **Figura 6C,D**.



**Figura 10.** Ensayo de Inmunofluorescencia en la línea celular SK-N-BE(2) tratada con ácido retinoico y/o AG-221.

De manera global a las distintas aproximaciones experimentales realizadas, hemos observado cómo el tratamiento de la combinación de AR con AG-221 sí tiene un efecto en las células SH-SY5Y, pero no en las células SK-N-BE(2). Una posibilidad es que la diferencia al doble tratamiento entre ambas líneas celulares se deba a la amplificación de *MYCN*. La amplificación de *MYCN* actuaría como impedimento transcripcional en la diferenciación neuronal de las células SK-N-BE(2). Nuestra hipótesis de trabajo actual es que bloqueando la expresión de *MYCN* se podría mejorar la respuesta de diferenciación neuronal con la combinatoria de fármacos propuesta.

Una posibilidad para conseguir una terapia más eficaz en células con *MYCN* amplificado sería el combinar el doble tratamiento con un tercer fármaco: los inhibidores de bromodominios. Los inhibidores de bromodominios están dirigidos contra los factores de transcripción BET, de los que depende la misma transcripción de *MYCN* (Alleboina *et al.*, 2021). De esta manera, se podría conseguir una diferenciación celular más eficiente y reducir las características de célula troncal cancerosa implicadas en mayor supervivencia y proliferación celulares, así como en el de mayor resistencia a los tratamientos.

## CONCLUSIONES

1. Al tratar la línea SH-SY5Y con la combinatoria de AR y AG-221 se observó un sinergismo que llevó a la reducción de la proliferación y supervivencia celulares y al aumento de la neuritogénesis de manera más óptima que con el tratamiento con AR.
2. El tratamiento de la combinatoria de AR y AG-221 en la línea SK-N-BE(2) no produjo ningún efecto significativo en la proliferación y supervivencia celulares, ni en la neuritogénesis.
3. La terapia combinada de AR y AG-221 promovió la diferenciación celular en la línea SH-SY5Y pero no en la línea SK-N-BE(2).

## BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., Ohira, M., Kaneda, A., Yagi, Y., Yamamoto, S., Kitano, Y., Takato, T., Nakagawara, A., & Ushijima, T. (2005). CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Research*, 65(3), 828-834.
- Alleboina, S., Aljouda, N., Miller, M., & Freeman, K. W. (2021). Therapeutically targeting oncogenic CRCs facilitates induced differentiation of NB by RA and the BET bromodomain inhibitor. *Molecular Therapy Oncolytics*, 23, 181-191. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.09.004>
- Bachetti, T., Paolo, D. D., Lascio, S. D., Mirisola, V., Brignole, C., Bellotti, M., Caffa, I., Ferraris, C., Fiore, M., Fornasari, D., Chiarle, R., Borghini, S., Pfeffer, U., Ponzoni, M., Ceccherini, I., & Perri, P. (2010). PHOX2B-Mediated Regulation of ALK Expression: In Vitro Identification of a Functional Relationship between Two Genes Involved in Neuroblastoma. *PLOS ONE*, 5(10), e13108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013108>
- Baker, D. L., Schmidt, M. L., Cohn, S. L., Maris, J. M., London, W. B., Buxton, A., Stram, D., Castleberry, R. P., Shimada, H., Sandler, A., Shamberger, R. C., Look, A. T., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., & Matthay, K. K. (2010). Outcome after Reduced Chemotherapy for Intermediate-Risk Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, 363(14), 1313-1323. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001527>
- Borriello, L., Seeger, R. C., Asgharzadeh, S., & DeClerck, Y. A. (2016). More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. *Cancer letters*, 380(1), 304-314. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.017>
- Cheung, N.-K. V., & Dyer, M. A. (2013). Neuroblastoma: Developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 13(6), 397-411. <https://doi.org/10.1038/nrc3526>
- Cheung, N.-K. V., Zhang, J., Lu, C., Parker, M., Bahrami, A., Tickoo, S. K., Heguy, A., Pappo, A. S., Federico, S., Dalton, J., Cheung, I. Y., Ding, L., Fulton, B., Wang, J., Chen, X., Becksfors, J., Wu, J., Billups, C. A., Ellison, D., ... Dyer, M. A. (2012). Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients with Neuroblastoma. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 307(10), 1062-1071. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.228>
- Cohn, S. L., Pearson, A. D. J., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldut, A., Hero, B., Ichihara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V., & Matthay, K. K. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification

- System: An INRG Task Force Report. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), 289-297.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6785>
- Dang, L., Yen, K., & Attar, E. C. (2016). IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Annals of Oncology*, 27(4), 599-608.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw013>
  - De Bernardi, B., Mosseri, V., Rubie, H., Castel, V., Foot, A., Ladenstein, R., Laureys, G., Beck-Popovic, M., de Lacerda, A. F., Pearson, A. D. J., De Kraker, J., Ambros, P. F., de Rycke, Y., Conte, M., Bruzzi, P., & Michon, J. (2008). Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG1 study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. *British Journal of Cancer*, 99(7), 1027-1033. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604640>
  - Eggert, A., Ikegaki, N., Liu, X. G., & Brodeur, G. M. (2000). Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. *Klinische Padiatrie*, 212(4), 200-205.  
<https://doi.org/10.1055/s-2000-9677>
  - Gilbert, S. F. (2000). *The Neural Crest. Developmental Biology*. 6th Edition.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10065/>
  - Grimmer, M. R., & Weiss, W. A. (2006). Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development. *Current Opinion in Pediatrics*, 18(6), 634-638.  
<https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32801080fe>
  - Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J., & Delattre, O. (2008). Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 967-970.  
<https://doi.org/10.1038/nature07398>
  - Ježek, P. (2020). 2-Hydroxyglutarate in Cancer Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 33(13), 903-926. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7902>
  - Joshi, V. V., & Tsongalis, G. J. (1997). Correlation between morphologic and nonmorphologic prognostic markers of neuroblastoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 824, 71-83. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb46210.x>
  - Kholodenko, I. V., Kalinovsky, D. V., Doronin, I. I., Deyev, S. M., & Kholodenko, R. V. (2018). Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, 2018, 7394268. <https://doi.org/10.1155/2018/7394268>
  - Mahapatra, S., & Challagundla, K. B. (2022). Neuroblastoma. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448111/>

- Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Seeger, R. C., Stram, D. O., Harris, R. E., Ramsay, N. K., Swift, P., Shimada, H., Black, C. T., Brodeur, G. M., Gerbing, R. B., & Reynolds, C. P. (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Children's Cancer Group. The New England Journal of Medicine*, 341(16), 1165-1173. <https://doi.org/10.1056/NEJM199910143411601>
- Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N. J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., ... Maris, J. M. (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, 455(7215), 930-935. <https://doi.org/10.1038/nature07261>
- Parodi, F., Passoni, L., Massimo, L., Luksch, R., Gambini, C., Rossi, E., Zuffardi, O., Pistoia, V., & Pezzolo, A. (2011). Identification of novel prognostic markers in relapsing localized resectable neuroblastoma. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 15(3), 113-121. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0085>
- Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., & Maurer, B. J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Letters*, 197(1), 185-192. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00108-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00108-3)
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Yamanaka, S. (2013). The Winding Road to Pluripotency (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 52(52), 13900-13909. <https://doi.org/10.1002/anie.201306721>