

Delia D'Avola<sup>1,2</sup>, Leire Neri<sup>2</sup>, Marta Lasa<sup>2</sup>, Mercedes Iñarrairaegui<sup>1</sup>, José Ignacio Herrero<sup>1</sup>, Jesús Prieto<sup>1,2</sup>, Bruno Sangro<sup>1,3</sup>, Rafael Aldabe<sup>2,3</sup>

1 Clínica Universidad de Navarra, Unidad de Hepatología y Ciberehd, Pamplona; 2 Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Programa de Terapia Génica y Regulación de la Expresión Génica, Pamplona; 3 Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Pamplona

## Introducción y objetivo

La identificación de nuevas dianas terapéuticas para terapias sistémicas es una de las principales necesidades en el tratamiento del hepatocarcinoma (HCC). Recientemente hemos comprobado que el enzima NatB acetila aminoterminalmente al 10% de las proteínas humanas, siendo su actividad esencial para el funcionamiento del citoesqueleto de actina, orgánulo con gran relevancia en el desarrollo tumoral. El objetivo de este estudio fue estudiar el potencial terapéutico de la inhibición del enzima NatB en el HCC y su relación con el desarrollo y el pronóstico del HCC en humanos.

## Métodos

Se han analizado los efectos de la inhibición de la expresión de NatB sobre las líneas de HCC humano Huh7 y PLC/PRF/5 estudiando su proliferación y señalización in vitro y su capacidad de generar tumores en modelos murinos de xenotransplante cuando se inhibe la expresión del enzima mediante RNAs interferentes.

Posteriormente, en una serie de 31 pacientes con HCC en estadio BCLC A (74%) o B (26%) tratados con trasplante o resección quirúrgica se ha analizado la expresión proteica de las dos subunidades de NatB en muestras pareadas de tejido tumoral e hígado no tumoral.

Finalmente, se ha estudiado la asociación de la expresión de NatB en estas muestras con variables clínicas, radiológicas e histológicas relacionadas con el pronóstico del tumor.

Para el análisis estadístico se empleó el test de chi cuadrado; se consideraron significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 1. Expresión de hNatB en HCC

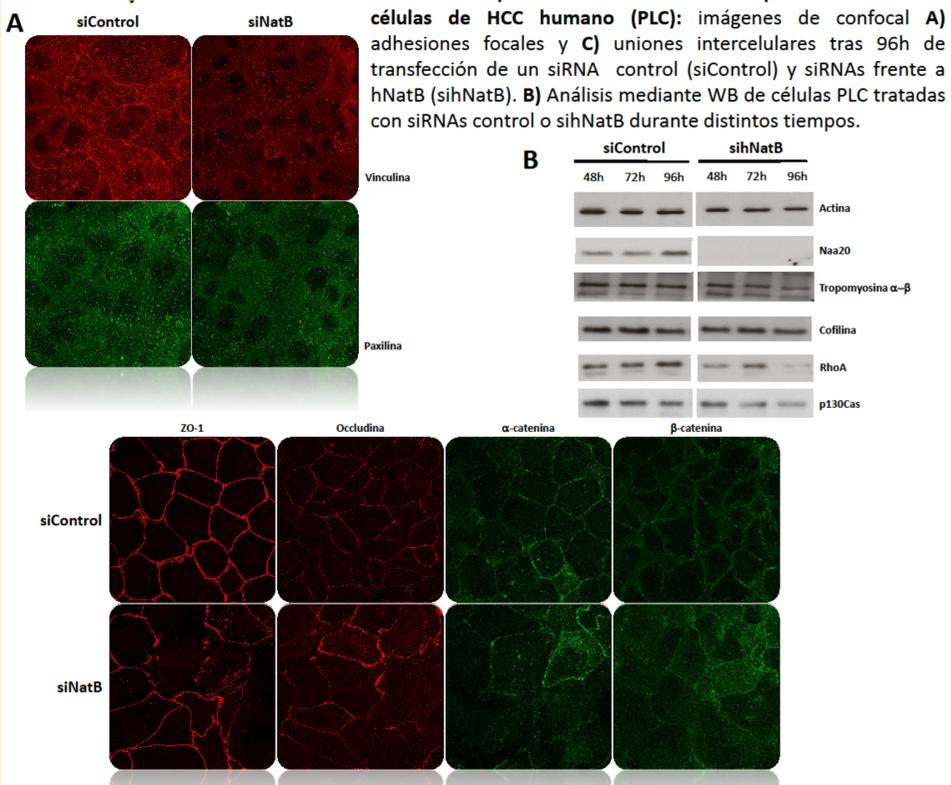
En más de la mitad (51%) de las muestras de pacientes con HCC se ha encontrado una sobreexpresión de NatB en el tejido tumoral con respecto al hígado no tumoral. Además, se ha observado una asociación significativa entre la invasión vascular microscópica y la sobreexpresión de ambas subunidades de NatB ( $p=0,03$ ).

También se ha observado una asociación de la sobreexpresión de las dos subunidades con el sexo femenino ( $p=0,02$ ). No se han detectado ninguna otra asociación entre la expresión de NatB y el estadio tumoral, la multinodularidad, el grado de diferenciación del tumor o la etiología de la hepatopatía subyacente.

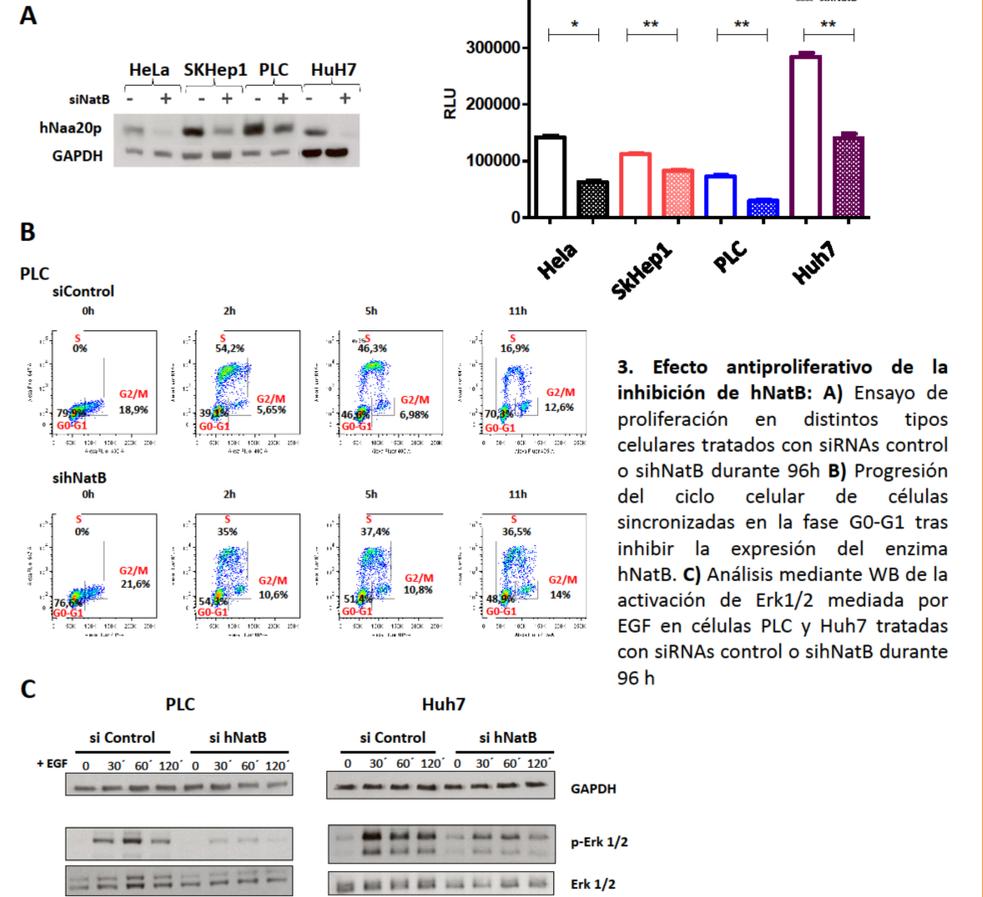
|                                | Sobreexpresión de subunidades de hNatB en el tejido tumoral vs no tumoral |              | p            |
|--------------------------------|---|--------------|--------------|
|                                | Si  | No           |              |
| Invasión vascular              | 100% (n=4)  | 0            | <b>0,03*</b> |
| Nódulo único                   | 46,2% (n=6)   | 53,8% (n=7)  | 0,60         |
| <b>Grado de diferenciación</b> |   |              |              |
| Alto (Edmonson 1-2)            | 60% (n=6)   | 40% (n=4)    | 0,51         |
| Bajo (Edmonson 3-4)            | 52,4% (n=11)  | 47,6% (n=10) |              |
| <b>Estadio tumoral</b>         |   |              |              |
| BCLC A                         | 47,8% (n=11)  | 52,2% (n=12) | 0,47         |
| BCLC B                         | 62,5% (n=5)   | 37,5% (n=3)  |              |
| Cirrosis                       | 55,6% (n=15)  | 44,4% (n=12) | 0,25         |
| Sexo Femenino                  | 0   | 100% (n=4)   | <b>0,02*</b> |

## 2. Citoesqueleto de actina

**2. Análisis de proteínas asociadas al citoesqueleto de actina en células de HCC humano (PLC): imágenes de confocal A) adhesiones focales y C) uniones intercelulares tras 96h de transfección de un siRNA control (siControl) y siRNAs frente a hNatB (sihNatB). B) Análisis mediante WB de células PLC tratadas con siRNAs control o sihNatB durante distintos tiempos.**



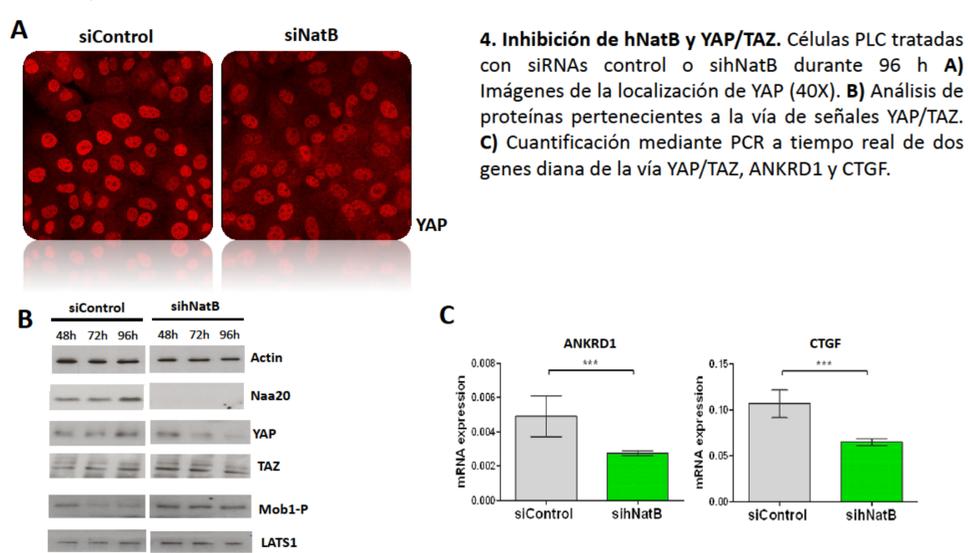
## 3. Proliferación



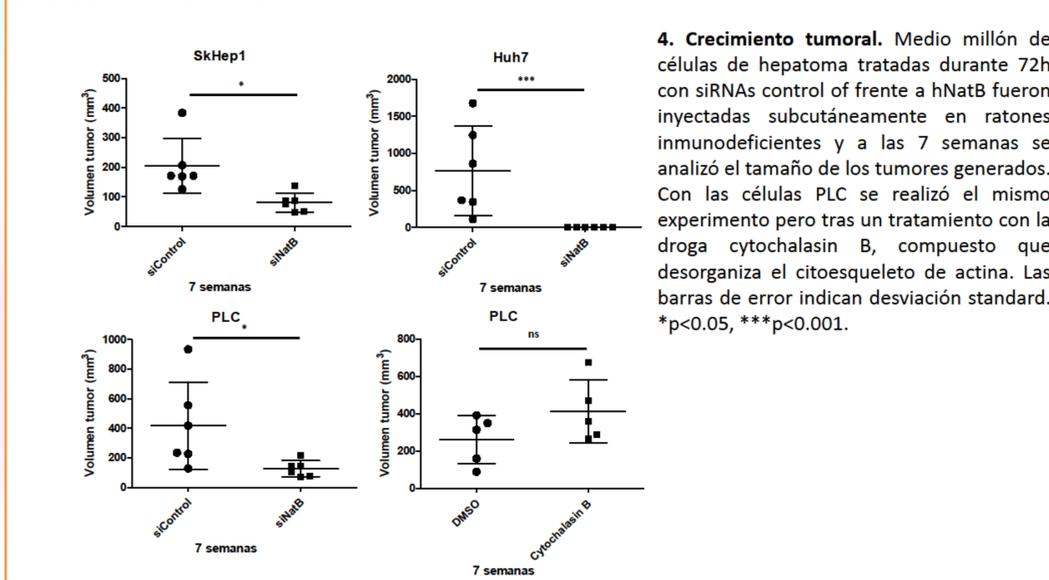
**3. Efecto antiproliferativo de la inhibición de hNatB:** A) Ensayo de proliferación en distintos tipos celulares tratados con siRNAs control o sihNatB durante 96h B) Progresión del ciclo celular de células sincronizadas en la fase G0-G1 tras inhibir la expresión del enzima hNatB. C) Análisis mediante WB de la activación de Erk1/2 mediada por EGF en células PLC y Huh7 tratadas con siRNAs control o sihNatB durante 96 h

## 4. YAP/TAZ

**4. Inhibición de hNatB y YAP/TAZ.** Células PLC tratadas con siRNAs control o sihNatB durante 96 h A) Imágenes de la localización de YAP (40X). B) Análisis de proteínas pertenecientes a la vía de señales YAP/TAZ. C) Cuantificación mediante PCR a tiempo real de los genes diana de la vía YAP/TAZ, ANKRD1 y CTGF.



## 5. Crecimiento tumoral



**4. Crecimiento tumoral.** Medio millón de células de hepatoma tratadas durante 72h con siRNAs control o frente a hNatB fueron inyectadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes y a las 7 semanas se analizó el tamaño de los tumores generados. Con las células PLC se realizó el mismo experimento pero tras un tratamiento con la droga cytochalasin B, compuesto que desorganiza el citoesqueleto de actina. Las barras de error indican desviación standard. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## CONCLUSIONES

La acetilación aminoterminal de proteínas mediada por el enzima NatB podría ser una nueva diana terapéutica frente al HCC dada la capacidad antitumoral observada cuando se inhibe su expresión en células humanas de HCC. Existe sobreexpresión de hNatB en el HCC humano y se asocia a la presencia de invasión vascular microscópica por lo que la sobreexpresión de hNatB podría conferir un peor pronóstico al tumor. Estos datos deben de ser confirmados en una serie más amplia de pacientes en distintos estadios de enfermedad

