

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto de la nicotinamida como inhibidor de la poli (ADP-ribosa) polimerasa en cáncer de mama deficiente de BRCA1.

TESIS

Que para obtener el grado de:
Doctor (a) en Biología Experimental

Presenta:

M en BE. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

Co-tutores:

Dr. Alfonso Dueñas González

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Asesor:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Comité Tutorial

CO-TUTOR

Dr. Alfonso Dueñas González

Laboratorio de Epigenética
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología
alfonsoduenasg@yahoo.mx

CO-TUTOR

Dr. Luís Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 203457.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, aprobó la tesis titulada: "Efecto de la nicotinamida como inhibidor de la poli (ADP-ribosa) polimerasa en cáncer de mama deficiente de BRCA1" que presentó

María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

El día 15 de Diciembre del 2014.

Sinodales

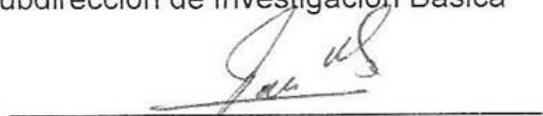
Presidente

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Profesor-Investigador "C"
Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa
D.C.B.S. Depto. Ciencias de la Salud



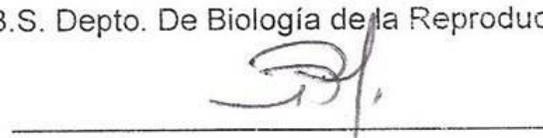
Secretaria

Dra. Patricia García López.
Investigador en ciencias médicas "D"
Instituto Nacional de Cancerología
Subdirección de Investigación Básica



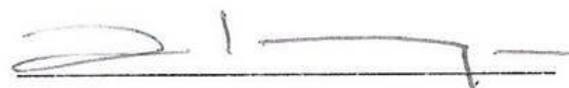
Vocal

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Profesor-Investigador "C"
Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa
D.C.B.S. Depto. De Biología de la Reproducción



Vocal

Dra. Elena Aréchaga Ocampo
Profesor-Investigador "C"
Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa
Depto. Ciencias Naturales



Agradecimientos

Al CONACYT por su apoyo brindado a la investigación en México y sobre todo a la formación de nuevos investigadores.

Al Doctorado en Biología Experimental por haberme dado la oportunidad de formar parte de su programa.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, por haberme aceptado como alumna desde hace 10 años. Por sus enseñanzas tanto de biología y genética molecular y sobre todo por creer en mí y haberme impulsado para seguir en el campo de la investigación.

Al Dr. Alfonso Dueñas González, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por permitirme realizar esta tesis en su laboratorio así como por todo su apoyo y paciencia durante estos 8 años.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por haberme dirigido en la realización de esta tesis, por todos sus consejos positivos y su carácter siempre optimista.

Al laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Cancerología por haberme permitido realizar este proyecto.

Al laboratorio de Fisiología Celular (S-351) de la UAM-Iztapalapa por el apoyo brindado.

Al personal técnico de microscopia confocal de la UAM-I por todo el apoyo, brindado.

Dedicatorias

A mí adorado José de la Luz por estar a mi lado y por todo su apoyo, comprensión, paciencia y especialmente por haberme enseñado que no hay límites en la vida.

A mis hermosos hijos que me han enseñado que puedo llegar hacer todo lo que me proponga en la vida con ellos de la mano.

A mi madre por todos sus regaños pues sin estos no estaría aquí.

A mi padre porque nunca me negó ningún libro.

A mis hermanos por su apoyo y comprensión para poder concluir esta etapa tan importante de mi vida.

A mí abuelita por el apoyo de toda la vida, paciencia, cariño, buenos consejos y por seguir a mi lado incondicionalmente.

A mi tía por todo su cariño.

A mis mejores amigos Jorge y Nadia que han estado a mi lado durante todos estos años y han sido un ejemplo de superación y amistad.

A mi querida UAM- I por recibirme como alumna de su campus durante estos 15 años.

A mis queridos amigos y compañeros del INCAN Alma, Olguita, Dra. Vidal, Caty, Lucy, Enrique, Aurora.

Y a Dios por darme la vida y permitirme seguir aquí cumpliendo mis sueños.

INDICE GENERAL	Página
Lista de figuras y tablas	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. Introducción General	1
1.1. Cáncer de mama asociado a BRCA	1
1.2. Genes de predisposición a cáncer BRCA1 y BRCA2	2
1.3. BRCA y los mecanismos de reparación del ADN	

por RH	4
1.4. Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP)	6
1.5. Inhibidores de PARP-1	9
1.6. Nicotinamida	11
1.7. Ensayos clínicos con inhibidores de PARP-1	12
1.8. Agentes quimioterapéuticos: cisplatino	16
2. Antecedentes	18
3. Justificación	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivo general	19
6. Objetivos específicos	20
7. Material y Métodos	21
7.1. Líneas celulares	21
7.2. Cultivos celulares	21
7.3. Ensayo de actividad para PARP in vitro y con la proteína endógena de células de cáncer de mama	21
7.4. Inmunofluorescencia	22
7.5. Ensayo de proliferación celular	23
7.6. Análisis de la viabilidad celular	23
7.7. Ensayo clonogénico	24
7.8. Silenciamiento de PARP-1	24
7.8.1. Extracción de proteínas	25
7.8.2. Western blot	25
7.9. Análisis del sinergismo	26

7.10. Análisis estadístico	27
8. Resultados	27
9. Discusión	41
10. Conclusión	45
11. Bibliografía	46

Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Diagrama esquemático de la proteína BRCA1 y su interacción con otras proteínas.	5
2	Organización estructural de la proteína PARP-1.	7
3	El papel de PARP-1 en la reparación de rupturas de cadena sencilla del DNA vía el mecanismo de reparación por escisión de bases.	8
4.	Características estructurales de los inhibidores de PARP.	11
5	Estructura química de la nicotinamida.	12

6	Modelo esquemático de la teoría de la “Letalidad sintética”	14
7	Mecanismo de acción del cisplatino.	17
8	Efecto de la nicotinamida (NAM) sobre la actividad de PARP-1 in vitro.	28
9	Efecto de la nicotinamida (NAM) sobre la actividad endógena de PARP-1.	29
10	Efecto de nicotinamida (NAM) sobre la formación de polímeros de ADP-ribosa(PAR).	30
11	Análisis del efecto de diferentes concentraciones de nicotinamida sobre la viabilidad de células MDA-MB-436, mediante el método CCK-8.	30
12	Efecto de la nicotinamida (NAM) y cisplatino sobre la viabilidad celular.	33
13	Efecto de nicotinamida (NAM), en combinación con cisplatino.	36
14	Efecto del RNA de interferencia (siRNA) específico para PARP-1 en células MDA-MB-436.	38
15	Curvas de supervivencia para determinar la dosis letal (DL) en las líneas celulares de cáncer mamario.	40
16	Efecto radiosensibilizador de la nicotinamida en presencia de radiación ionizante.	41

Tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Riesgo acumulado de cáncer de mama por edad en mujeres de familias con mutaciones de predisposición a cáncer.	3
2	Inhibidores de PARP-1 en diferentes fases de estudios clínicos.	15

3	Determinación de la concentración inhibitoria (CI50) de la viabilidad después del tratamiento con nicotinamida en líneas celulares de cáncer de mama.	34
4	Efecto sinérgico con nicotinamida y cisplatino en líneas de carcinoma mamario.	37

Abreviaturas

A

ADN	ácido desoxi-ribonucleico
ATM	ataxia telangiectasia mutado
ADPRT-1 gen	poli (ADP-ribosa) polimerasa
ATR	cinasa serina/treonina

B

BRCA1	Breast cancer, early onset 1
--------------	------------------------------

BRCA2	Breast cancer, early onset 2
C	
CDDP	cis-diaminodicloroplatino (II)
CI	Concentración Inhibitoria
F	
FANC	Fanconi anemia complementation group
H	
H1	proteína Histona 1
H2B	proteína Histona 2B
H2AX	H2A histone family, member X
M	
MRE11	proteína de reparación de rupturas de doble cadena del ADN
N	
NIEHS	National Institute of Environmental Health Sciences
NBS1	proteína de reparación de rupturas de doble cadena del ADN
NLS	señal de localización nuclear
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
P	

PCNA	Antigen de Proliferación Celular Nuclear
PARP-1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBT	Proteína de unión a la caja TATA
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
R	
Rad	miembros de la familia de proteínas recombinantes
RH	Recombinación Homologa
RRCS	Reparación de Rupturas de Cadena Sencilla del ADN
REB	Reparación por escisión de bases
RCS	Rupturas de Cadena Sencilla del ADN
RCD	Rupturas de Cadena Doble del ADN

RESUMEN

Introducción: La enzima nuclear poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) es esencial para la reparación de rupturas de cadena sencilla del ADN por la vía de reparación por escisión de bases y representa un blanco importante en la terapia contra el cáncer. Los Inhibidores de PARP-1 han demostrado potenciar los efectos citotóxicos de la radiación ionizante y de agentes quimioterapéuticos como el carboplatino que dañan el ADN o inhibidores de la topoisomerasa I. La nicotinamida se ha descrito como un inhibidor de PARP-1 *in vitro*, y la gran mayoría de los inhibidores de PARP -1 se basan en su estructura química. Resultados *in vitro* e *in vivo* y más recientemente de ensayos clínicos, sugieren que los inhibidores de PARP-1 pueden ser usados tanto como sensibilizadores de quimioterapia o radioterapia así como en monoterapia, ocasionando la muerte específicamente en células tumorales con defectos en los mecanismos de reparación del ADN, en particular, aquellos tipos de cáncer con mutaciones en los genes que codifican las proteínas BRCA1 y BRCA2. A esta estrategia experimental se le ha denominado “letalidad sintética”. En este estudio analizamos

el efecto de la nicotinamida en células de carcinoma mamario proficientes y deficientes de BRCA1.

Metodologías: El efecto de la nicotinamida como inhibidor de PARP-1 fue determinado mediante un ensayo de actividad de PARP-1 *in vitro* y posteriormente en células MDA-MB-436. Este efecto se comprobó mediante inmunofluorescencia en células de carcinoma mamario tratadas con nicotinamida en presencia de daño al ADN. Posteriormente, analizamos el efecto de la nicotinamida y su combinación con cisplatino mediante ensayos de viabilidad celular en las líneas MDA-MB-436, MDA MB-231 y MCF-7 de carcinoma mamario. Cada una con diferentes estados de BRCA1. Finalmente, analizamos el efecto de nicotinamida como radiosensibilizador mediante ensayos de clonogénicos.

Resultados: La nicotinamida inhibe la actividad de PARP-1 *in vitro* y de PARP-1 endógena en células de cáncer de mama MDA-MB-436 deficientes de BRCA1. Este efecto también fue observado en células de cáncer de mama en presencia de daño al ADN. Posteriormente demostramos que la nicotinamida disminuye la viabilidad de las células MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7. El análisis de sinergismo demostró un efecto sinérgico con nicotinamida y cisplatino en las células MDA-MB-436 y MCF-7. Finalmente observamos que la nicotinamida sensibiliza significativamente a las células MDA-MB-436 y MDA-MB-231 al tratamiento con radiación ionizante.

Discusión: Estos resultados sugieren que la sensibilidad al cisplatino observada en las líneas celulares tratadas con nicotinamida está influenciada por el estado de BRCA1, sin embargo en las células MDA-MB-231 cabe resaltar que existen otros factores genéticos como el estado triple negativo de la línea celular que podrían estar jugando un papel importante. Por otro lado, la respuesta al tratamiento con nicotinamida y radiación ionizante en las células MCF-7 podría estar asociada al estado deficiente de la caspasa 3, debido a que se ha reportado un incremento en la resistencia a la radiación ionizante en células deficientes de caspasa 3.

Conclusión: nuestros resultados sugieren que la nicotinamida podría ser utilizada como sensibilizador a la quimioterapia y radioterapia en cáncer de mama y de manera más selectiva en células tumorales deficientes de BRCA1. Interesantemente, estos resultados también podrían sugerir que la inhibición de PARP-1 por nicotinamida podría estar favoreciendo la letalidad sintética en nuestro modelo.

ABSTRACT

Introduction: The nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is essential for the repair of single-strand breaks in DNA by means of base excision repair and represents an important target in the therapy cancer. Inhibitors of PARP-1 have been shown to potentiate the cytotoxic effects of ionizing radiation and chemotherapeutic agents such as carboplatin that DNA damaging or inhibitors topoisomerase I. Nicotinamide has been described as an inhibitor of PARP-1 in vitro, and the vast majority of PARP inhibitors are based on their chemical structure. Results in vitro and in vivo and clinical trials recently, suggest that PARP inhibitors can be used as sensitizers to chemotherapy or radiotherapy as well as monotherapy, killing specifically cancer cells with defective in repair mechanisms DNA, particularly those cancers with mutations in the genes encoding proteins BRCA1 and BRCA2. In this experimental strategy has been called "synthetic lethality". In this study we analyzed the effect of nicotinamide in cancer cells proficient and deficient BRCA1.

Methods: The effect of the nicotinamide as an inhibitor of PARP-1 was determined by activity assays in vitro PARP-1 and MDA-MB-436 cells. This effect was verified

by immunofluorescence in mammary carcinoma cells treated with nicotinamide in the presence of DNA damage. Subsequently, we analyzed the effect of nicotinamide in combination with cisplatin in cell viability assays in MDA-MB-436 (BRCA1-deficient), MDA MB-231 (BRCA1-proficient) and MCF-7 (BRCA1, low levels of expression) cancer cells. Finally, we analyze the effect of nicotinamide as radiosensitizer by clonogenic assays.

Results: our results demonstrated that nicotinamide inhibits PARP-1 activity in vitro and in MDA-MB-436 mammary carcinoma BRCA1-deficient. This effect was also observed in breast cancer cells in the presence of DNA damage. Later demonstrated that nicotinamide decreases viability of MDA-MB-436, MDA-MB-231 and MCF-7. Analysis of the data

by the isobologram method showed that the combination of nicotinamide and cisplatin produced a synergistic antiproliferative effect in MDA-MB-436 and MCF-7 cancer cells. Finally we observed that the nicotinamide also sensitizes MDA-MB-436 and MDA-MB-231 cancer cells to ionizing radiation.

Discussion: these results suggesting that nicotinamide sensitizes cancer cells cisplatin treatment and that this effect is influenced by the status of BRCA1, however in MDA-MB-231 cells should take into account other genetic factors as the status triple negative of cell line. On the other hand, the response to treatment with nicotinamide y ionizing radiation in MCF-7 cells could be associated to deficiency of caspase 3, because it has been reported an increase resistance to ionizing radiation in cancer cells deficient in caspase 3.

Conclusion: we results suggest that nicotinamide may be used with sensitizer to chemotherapy and radiotherapy in breast cancer more selectively in BRCA1 deficient BRCA1 cancer cells. Interestingly, these results also suggest that inhibition of PARP-1 by nicotinamide may be favoring synthetic lethality in breast cancer cells.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama asociado a BRCA

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial¹. Se han identificado muchos factores de riesgo, sin embargo, la historia familiar se encuentran dentro de los más importantes para este padecimiento, teniendo aproximadamente dos veces mayor riesgo a desarrollar la enfermedad los familiares de primer grado de una paciente afectada. La mayoría de los casos familiares de cáncer de mama se presentan a edad temprana, comparados con aquellos casos esporádicos y, por lo tanto, los factores genéticos tienen mayor relevancia en su desarrollo. La mayoría de los casos familiares de cáncer de mama representan cerca del 10% y están asociados con mutaciones autosómicas dominantes en los genes BRCA1, BRCA2 o ambos.

El riesgo a desarrollar cáncer de mama asociado con mutaciones en BRCA1 y BRCA2 es muy alto, cerca del 85%, en comparación con el cáncer de ovario que es del 44%. Las características que presentan las pacientes con mutaciones en BRCA son: cáncer de mama a edad temprana (menos de 40 años), enfermedad bilateral, historia familiar de cáncer de mama u ovario³.

Desde la identificación de los genes BRCA1 en 1994 y BRCA2 un año después, las pruebas moleculares para la detección de mutaciones en estos genes de susceptibilidad a cáncer de mama han aumentado y rápidamente se han incorporado a la práctica clínica diaria de la oncología. Ahora, el asesoramiento genético y el diagnóstico molecular se ha ofrecido de manera rutinaria en las

clínicas de cáncer familiar de los hospitales especializados como el Instituto Nacional de Cancerología para el diagnóstico y el tratamiento de este tipo de pacientes y, aunque los casos de cáncer hereditarios en México son del 5 al 10%, es importante identificarlos y referirlos con el genetista, ya que además de ofrecer el diagnóstico molecular a la paciente afectada y a sus familiares en posible riesgo, en aquellos casos con resultados positivos de una mutación se pueden ofrecer estrategias de seguimiento e incluso quimioprevención (quimioprofilaxis) y cirugía profiláctica.

Genes de predisposición a cáncer BRCA1 y BRCA2

Un estudio de penetrancia genética (cuando en una población, la proporción de individuos que expresan el fenotipo patológico, entre todos los que presentan un genotipo portador de un alelo mutado) demostró que las mutaciones de BRCA1 en familias con cuatro o más individuos con cáncer de mama u ovario antes de los 50 años presenta 85% de riesgo a desarrollar cáncer de mama en las mujeres de esa familia (Tabla 1). Por otro lado, en familias con mutaciones en BRCA2 también se han observado que incrementa el riesgo a desarrollar cáncer de mama en mujeres y hombres.^{41, 42}

Tabla 1. Riesgo acumulado de cáncer de mama por edad en mujeres de familias con mutaciones de predisposición a cáncer.

Edad (años)	Riesgo acumulado	
	BRCA1	BRCA2
30	3.2%	4.6%
40	19.1%	12%
50	50.8%	46%
60	54.2%	61%
70	85%	86%

El gen de BRCA1 (por sus siglas en inglés, breast cancer 1, early onset) está localizado en el cromosoma 17q21 y tiene una secuencia muy larga de 5,589 nucleótidos por otro lado, el gen de BRCA2 (por sus siglas en inglés, breast cancer 2, early onset) está localizado en el cromosoma 13q12 y su secuencia es de 10,254 nucleótidos. Ambos genes son componentes esenciales del mecanismo de reparación de rupturas de doble cadena (RDC) del ADN mediante el sistema de recombinación homóloga (RH) y la primera evidencia de la existencia de este gen se obtuvo por el laboratorio del Dr. King de la Universidad de California (Berkeley) en 1990 y cuatro años después, el gen fue clonado por la Universidad de Utah, en el 'National Institute of Environmental Health Sciences' (NIEHS) y 'Myriad Genetics'. El gen BRCA1 codifica una proteína de 1863 aminoácidos y el gen BRCA2 codifica una proteína de 3418 aminoácidos, ambas proteínas fueron identificados mediante clonación posicional.

Un estudio demostró que las células mutantes de BRCA1 y BRCA2 son deficientes en el mecanismo de reparación por RH de RDC del ADN que finalmente resulta en una inestabilidad cromosómica⁷. Interesantemente, la mayoría de las 3500 mutaciones por pérdida de nucleótidos (“deleciones”) reportadas en estos genes se ha encontrado en toda la secuencia codificante y se han asociado con cáncer de mama, ovario próstata, páncreas y endometrio. Los tumores asociados con “deleciones” en BRCA1 y BRCA2 carecen de la funcionalidad del gen *brca* lo cual induce inestabilidad genómica forzando la progresión del cáncer.

BRCA y los mecanismos de reparación del ADN por RH

BRCA1 y BRCA2 actúan como genes supresores de tumores debido a que participan como reguladores en los procesos de reparación del ADN, transcripción y ciclo celular en respuesta al daño del ADN. En estos procesos BRCA1 y BRCA2 se ha relacionado con la reparación por RH debido a que se ha demostrado que ambas proteínas se co-localizan con el componente esencial de la RH, la proteína Rad51, en los sitios del ADN dañado y a la horquilla de replicación, marcada por PCNA, en la fase de síntesis del ADN (fase S) del ciclo celular²⁴. Estos resultados fueron confirmados en otro trabajo en donde se observó que la inactivación de BRCA1 y BRCA2 inhibe la activación de la RH, mediada por Rad51, e incrementa la sensibilidad a agentes que inducen daño al ADN³². Otro estudio demostró que la deficiencia en BRCA1 y BRCA2 en células de ratón y de humano favorece aberraciones cromosómicas, incluyendo rupturas de las cromátidas y cromosomas, así como cromosomas triradiales y cuadriradiales, marcadores de anomalías en la fase S que son típicas de enfermedades con predisposición a

cáncer como ataxia telangiectasia y anemia de Fanconi con mutaciones en los genes *atm* y *fanc*, respectivamente³².

BRCA1 se localiza normalmente en el núcleo y presenta varios sitios de fosforilación y regiones de reconocimiento para otras proteínas, así como un dominio de dedos de zinc llamado RING, cercano a la región amino terminal, dos secuencias de señales de localización nuclear (NLS) en el exón 11, un sitio de transactivación entre los aminoácidos 1280-1524 y un dominio BRCT en el extremo carboxilo terminal. La región BRCT también fue identificada en una gran variedad de proteínas involucradas en la respuesta de daño al ADN (Figura1).

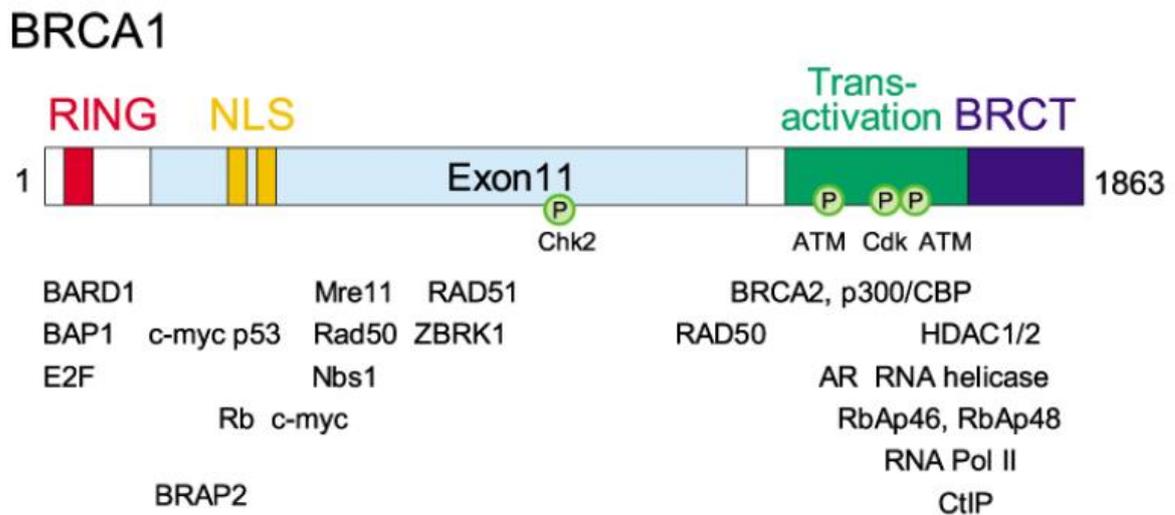


Figura 1. Diagrama esquemático de la proteína BRCA1 y su interacción con otras proteínas (tomado de Jang ER and Lee JS. Cancer Res Treat. 2004).

BRCA1 se une indirectamente a Rad51 en respuesta de daño al ADN o por su interacción con otras proteínas relacionadas con RH. Por ejemplo, se ha observado que BRCA1 es activada por hiperfosforilación de las proteínas ATM y ATR. Otros estudios sugieren que interactúa con Rad50, MRE11 y NBS1

(complejo MRN) en respuesta al daño del ADN y son co-localizados con otras proteínas implicadas en la RH^{19, 29, 42}. Estos estudios sugieren que BRCA juega un papel importante en las células tumorales con defectos en las vías de reparación del ADN.

Estudios recientes han utilizado inhibidores de PARP-1 como terapia blanco para el cáncer deficiente de BRCA1. La enzima nuclear poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) está involucrada en el mantenimiento de la integridad del genoma y es un componente importante en la reparación de rupturas de cadena sencilla del DNA (RCS). La inactivación de la reparación de RCS por inhibidores de PARP-1 durante la fase S induce a la formación de RDC y con ello confieren letalidad sintética a las células deficientes de la reparación del ADN mediada por RH⁵.

Con base en estos resultados se ha propuesto a PARP-1 como un nuevo blanco en la terapia del cáncer de mama².

Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP)

PARP-1 es una proteína nuclear de 116 kDa, codificada por el gen *adprt-1* poli (ADP-ribosa) polimerasa localizado en la posición q41-42 en el cromosoma 1. PARP-1 fue descubierta hace más de 40 años y en la actualidad se han identificado 18 miembros de la familia de proteínas PARP⁷. PARP-1 es una proteína evolutivamente conservada en todos los eucariontes y consiste en tres principales dominios. La región amino terminal (42 kDa) que presenta un dominio de unión al ADN, el cual incluye dos motivos de dedos de zinc así como una NLS. El dominio de automodificación central (16 kDa) de PARP-1 está localizado en la región central de la enzima, entre los residuos 374-525 y contiene 15 residuos de

glutamina conservados, los cuales son los blancos para la auto-poli ADP-ribosilación. El dominio catalítico de PARP-1 está localizado en el extremo carboxilo terminal entre los residuos 526-1014 y es de 55 kDa; sin embargo, la actividad ADP-ribosa transferasa está restringida en la región de 40 kDa en el extremo carboxilo terminal, cuyo dominio catalítico está dentro de la región altamente conservada de la proteína (Figura 2).

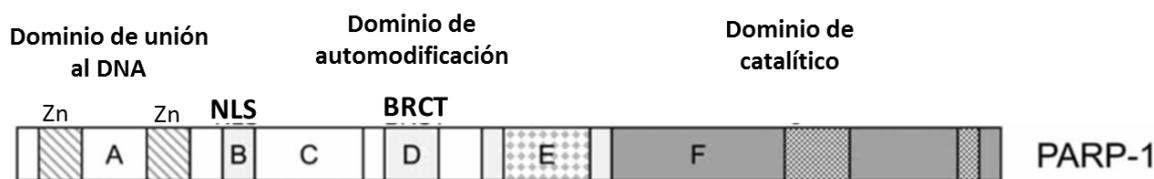


Figura 2. Organización estructural de la proteína PARP-1 (modificado de Zaremba T y Curtin NJ. Anticancer Agents Med Chem. 2007)

PARP-1 se une a los sitios de daño del ADN, específicamente sobre regiones que presentan RCS, mediante dos dominios de dedos de zinc con alta afinidad, activando la vía reparación por escisión de bases (REB) y con ello su actividad catalítica aumenta 500 veces. PARP-1 cataliza la adición de una unidad de ADP-ribosa a partir de su sustrato dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD⁺), después de 15 a 30 segundos de iniciar la señal de daño sobre las proteínas aceptoras y sobre ella misma, liberando nicotinamida. La reacción es iniciada por la formación de un enlace éster entre el aminoácido aceptor (Glutamato, Asparagina o Lisina) y la primera ADP-ribosa, la elongación de los polímeros involucra la catálisis de un enlace glicosídico, y se ha observado que la ramificación de los polímeros ocurre después de 20 unidades de ADP-ribosa y los puntos de ramificación son localizados cada 40-50 unidades¹³.

La adición de polímeros de ADP-ribosa ocurre en los extremos amino y carboxilo terminal de las histonas H1 y H2B, la cual crea una carga negativa sobre las RCS que favorecen la relajación de la cromatina en unos 30 nm y el acceso a los sitios dañados para el reclutamiento de las proteínas requeridas para la formación de los complejos multiproteicos implicados en la REB y la reparación de RCS del ADN (Figura 3)¹¹⁻¹³.

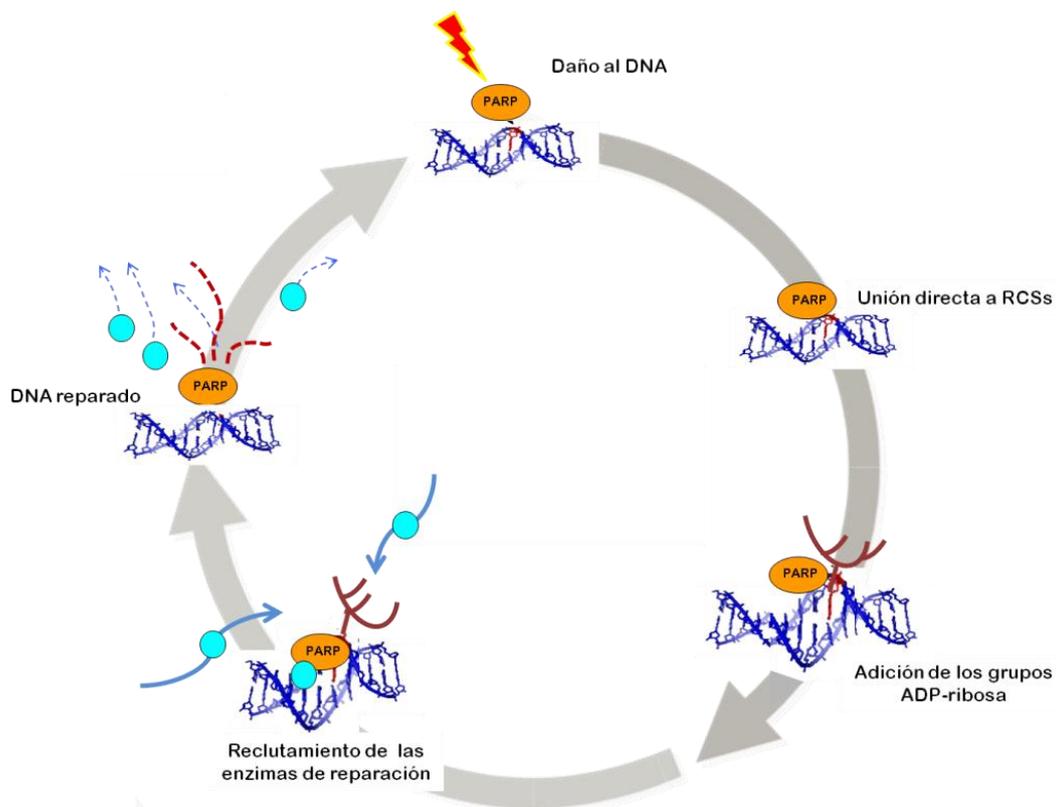


Figura 3. El papel de PARP-1 en la reparación de RCS del ADN vía el mecanismo de REB (modificado de Gien LT, Mackay HJ. J Oncol. 2010). PARP, poli ADP-ribosilación, ADP, poli Adeno ribosilación, RCS, rupturas de cadena sencilla. .

PARP-1 también puede regular otras proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN como ATM. Un estudio reciente demostró que PARP-1 puede reclutar a la proteína cinasa ATM en los sitios de RDC¹⁵. Interesantemente, otro

trabajo demostró que el tratamiento con inhibidores de PARP-1 en células deficientes de ATM induce muerte celular *in vitro* e *in vivo*¹⁶⁻¹⁷. Por otro lado, también se ha observado que la síntesis de poli (ADP-ribosa) polimerasa puede directamente o indirectamente regular la fosforilación de la histona H2AX, un marcador temprano de daño al ADN, lo que resulta en un retraso en la fosforilación de H2AX dependiente de ATM^{13,17}. También existe evidencia de que PARP-1 puede reclutar a MRE11, otra proteína implicada en la reparación RDC a través de RH¹⁴.

Inhibidores de PARP-1

Se ha reportado que PARP-1 se encuentra sobreexpresada en ciertos tipos de tumores sólidos y hematológicos, además se ha relacionado con la resistencia a agentes quimioterapéuticos¹⁰. Por este motivo se han diseñado una serie de inhibidores de PARP-1 que están siendo utilizados en el tratamiento contra el cáncer.

Estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que los inhibidores de PARP-1 pueden potenciar los efectos citotóxicos de la radiación ionizante y de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN³. Además, estudios preclínicos y clínicos de fase I sugieren que los inhibidores de PARP-1 pueden usarse como monoterapia, debido a que se ha observado que dan muerte selectiva a células tumorales con defectos en vías de reparación del ADN, específicamente aquellas con mutaciones en los genes de *brca1* y *brca2*⁴⁻⁶. Mutaciones germinales en los genes *brca1* y *brca2* dan lugar a defectos en la reparación de RDC por RH y están asociadas con un alto riesgo a desarrollar cáncer de mama⁶. Por lo tanto, tomar

ventaja de las células cancerosas con defectos en vías de reparación del ADN, inhibiendo una segunda vía de reparación mediante un fármaco parece ser una excelente oportunidad para el tratamiento del cáncer.

Debido a que el objetivo principal de las vías de reparación del ADN es promover la sobrevivencia celular, la inhibición de estas vías podría ser un blanco terapéutico contra el cáncer. Todos estos antecedentes demuestran el papel fundamental que tiene PARP-1 en la reparación del ADN y sobre otras proteínas implicadas en este proceso.

La gran mayoría de los inhibidores químicos de PARP-1 basan su acción en la unión al dominio catalítico de PARP-1, ejerciendo inhibición competitiva mediante la interacción transitoria del sitio de unión al NAD^+ , por lo que estos compuestos son denominados inhibidores clásicos o de primera generación. En este grupo se puede destacar a la 3-aminobenzamida (3-AB) uno de los primeros inhibidores de PARP-1 descrito hace más de 20 años y que ha demostrado una inhibición del 96% de la actividad de PARP-1 en concentraciones de 1 a 3 mM^2 .¹⁸ Este inhibidor, también ha demostrado efectos en la sensibilización a la radiación ionizante y agentes alquilantes en células tumorales como resultado de una deficiencia en la reparación del ADN a 5 mM ; sin embargo, a esta concentración la 3-AB también puede inhibir el metabolismo de la glucosa y la síntesis *de novo* de purinas, precursores necesarios para la síntesis de nucleótidos y de los ácidos nucleicos ADN y ARN¹⁹, lo que ha motivado al desarrollo de nuevos inhibidores más específicos.

Diversos estudios han demostrado las características que debe presentar un potente inhibidor capaz de bloquear la actividad enzimática de PARP-1 (figura 4): este debe poseer un anillo aromático o un sistema heterocíclico poliaromático, rico en electrones, que presente un enlace en la posición 3 de la benzamida y un grupo amida (-CONH₂) con al menos un hidrógeno libre, en forma de protón.

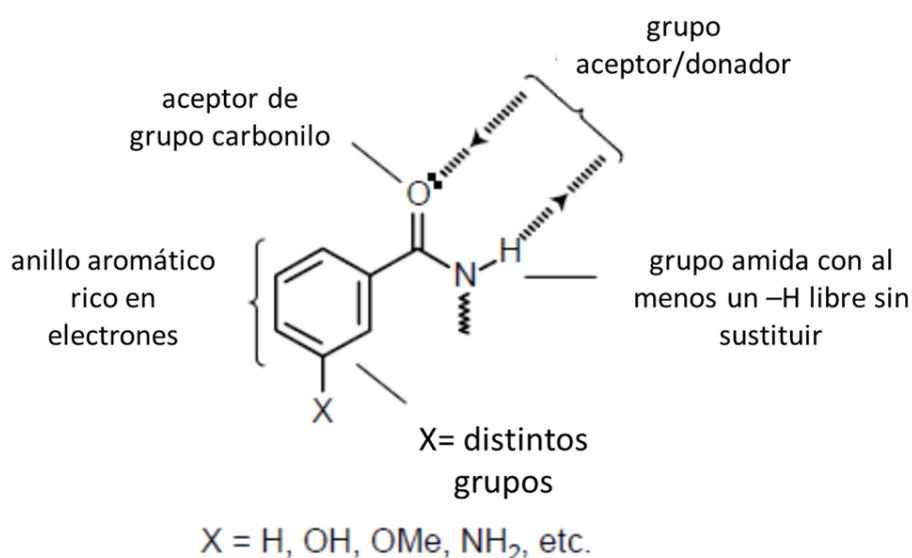


Figura 4. Características estructurales de los inhibidores de PARP-1 (modificado de Curtin NJ. Expert Rev Mol Med. 2005).

Nicotinamida

Otro inhibidor de PARP-1 de primera generación descrito es la nicotinamida, una amida de la vitamina B3 o niacina (figura 5) y un precursor del NAD⁺. La nicotinamida es originada por el catabolismo del NAD⁺ a través de la activación de PARP-1 y a su vez actúa como un inhibidor endógeno de ésta misma produciendo una regulación negativa por inhibición competitiva^{8, 43}. La nicotinamida presenta una actividad inhibitoria que se va incrementando conforme se adicionan otros

grupos químicos en su estructura, por lo que la mayoría de los inhibidores químicos de PARP-1 contienen en su estructura a la nicotinamida. Un estudio demostró que la nicotinamida puede reducir la actividad de PARP-1 y revertir el efecto resistente a cisplatino en células de cáncer de ovario murino. Curtin N y sus colaboradores demostraron en el 2005 que la nicotinamida sensibiliza células tumorales a radiación ionizante. Otro estudio demostró una disminución en la actividad de PARP-1 después del tratamiento con nicotinamida en un modelo murino de diabetes^{24,40}.

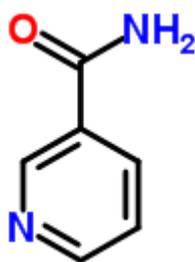


Figura 5. Estructura química de la nicotinamida

Ensayos clínicos con inhibidores de PARP-1

En el marco preclínico se ha demostrado que los inhibidores de PARP-1 pueden potencializar los efectos citotóxicos de la radiación ionizante y de agentes quimioterapéuticos, por lo que se han considerado sensibilizadores a quimioterapia para el tratamiento contra el cáncer²⁰.

Un trabajo realizado en modelos murinos con cáncer de mama, melanoma y glioma, se demostró que el inhibidor de PARP-1, ABT-888 presenta buena biodisponibilidad y potencializa los efectos de los compuestos de platino, temozolomida, ciclofosfamida y la radioterapia¹⁰. Otro trabajo demostró que otros

inhibidores de PARP-1, NU-1025 y PD128763, pueden potenciar el daño citotóxico de la temozolomida incrementando el daño al ADN en células L1210 de leucemia murina. Otro inhibidor de PARP-1, NU-1085 también demostró un efecto como potenciador de la citotoxicidad en combinación temozolomida en líneas celulares de cáncer de mama, ovario, colon y pulmón^{20, 21}. Actualmente existe una nueva generación de inhibidores como AG0146999 (Pfizer), KU0058684 y KU0058948 (AstraZeneca) que están siendo estudiados.

Interesantemente, dos trabajos publicados en la revista *Nature* en el 2005, demostraron que líneas celulares deficientes de BRCA1 y BRCA2 son sensibles a los inhibidores de PARP-1. El primero de estos trabajos demostró una disminución en la proliferación celular de células deficientes de BRCA-2 tratadas con los inhibidores NU1025 y AG14361⁵. En el segundo trabajo, Farmer y sus colaboradores demostraron que las células deficientes de BRCA1 y BRCA2 son sensibles a los inhibidores de PARP-1, KU0058684 y KU0058948⁶. Estos resultados sugieren que los inhibidores de PARP-1 pueden ser particularmente útiles para el tratamiento del cáncer con mutaciones en BRCA1 y BRCA2. El mecanismo que se ha propuesto para entender el efecto selectivo de los inhibidores de PARP-1 se basa en la inhibición de la actividad de PARP-1 la cual impide la reparación de RCS por la vía de reparación REB y favorece la persistencia e inclusive el aumento de RCS hasta la fase de la replicación del ADN, donde la horquilla de replicación puede colapsar dando lugar a la formación de RDC, y con ello favorecer la muerte celular. Mientras que en una célula normal las RDC son reparadas por la vía de RH a través de BRCA1 y BRCA2. Esto sugiere que las células deficientes de BRCA1 y BRCA2 son incapaces de reparar

las RDC y, por lo tanto, serán células no viables (Figura 6). Este efecto selectivo de los inhibidores de PARP-1 en células deficientes de BRCA1 y BRCA2 se ha definido con el término de “letalidad sintética”²². La letalidad sintética ocurre cuando se combina la pérdida de genes importantes, por ejemplo, si existe pérdida de la función de uno de los genes BRCA1 o BRCA2, y PARP-1 la célula puede seguir viviendo pero si existe la pérdida de dos de estos genes el efecto sería letal para la célula (Figura 6)²³.

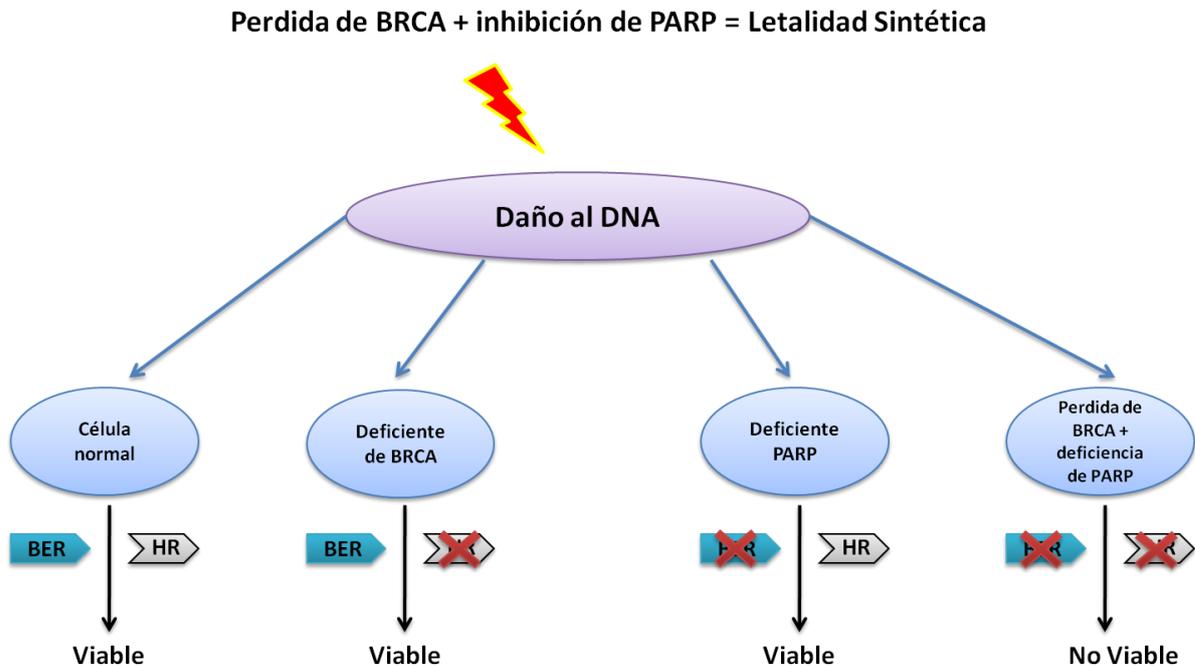


Figura 6. “Letalidad sintética” es el resultado de la pérdida de dos vías de reparación del ADN que llevan finalmente a la muerte celular. Cuando una o ambas proteínas BRCA o PARP son funcionales en las vías de reparación del ADN la célula puede responder a señales de daño al ADN y sobrevivir sin embargo, cuando ambas proteínas no son funcionales la célula es no viable.

La teoría de la letalidad sintética fue investigada en un modelo murino deficiente de BRCA2 en donde se demostró que el inhibidor de PARP-1, Olaparib

(AZD2281, KU-0059436) solo o en combinación con compuestos de platino aumentan el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia total. El tratamiento con Olaparib también demostró un efecto sobre la inhibición del crecimiento tumoral sin evidencia de efectos tóxicos²³.

La aplicación clínica de los inhibidores de PARP-1 en el tratamiento del cáncer de mama, inicialmente se basó en la evidencia preclínica de sus efectos quimio- o radio-potenciadores; enseguida se hicieron estudios de monoterapia con inhibidores PARP-1 en líneas celulares y modelos murinos deficientes de BRCA1 y BRCA2 (Tabla 2). Existen actualmente varios inhibidores que están siendo probados en fases clínicas y que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Inhibidores de PARP-1 en diferentes fases de estudios clínicos.

Inhibidores de PARP en estudio clínico 2009					
Agente	Compañía	Terapia combinación/solo	Vía de administración	Enfermedad	Estudio clínico
Olaparib AZD2281	Aztra Zeneca (London)	solo combinación (estudio)	oral	Tumores solidos Tumores deficientes- BRCA	Fase I completa Fase II en estudio
BSI-201	BiPar (USA)	combinación Gencitabine Carboplatino	i.v	Cáncer de mama tripe negativo	Fase II completa Fase III en estudio
AGO14699	Pfiser (La Jolla, USA)	solo combinación Temozolomide (TMZ)	i.v	Tumores solidos melanoma	Fase I y II en melanoma metastasico completa Fase II cáncer de mama-BRCA y ovario
ABT888	Abbotts Laboratories (USA, Chicago)	solo	oral	Tumores sólidos	Fase 0 y I completa
INO-1001	Inotek /Genentech (USA)	solo combinación TMZ	i.v	Melanoma Tumores de mama- BRCA	Fase I en estudio
MK-4827	Merk (NY)	solo	oral	Tumores sólidos de ovario-BRCA	Fase I en estudio
GPI-21016	MGI Pharma (USA)	combinación TMZ	oral	Tumores sólidos	Fase I en estudio
CEP-9722	Cephalon	combinación TMZ	oral	Tumores sólidos	Fase I en estudio

Estos datos sugieren que los inhibidores de PARP-1 pueden ser particularmente útiles para el tratamiento del cáncer con mutaciones en BRCA1 y BRCA2. Estudios etiológicos en cáncer han demostrado que el 50% de los casos de cáncer de mama hereditario está asociado con mutaciones en BRCA1 y cerca del 90% de los individuos que presentan estas mutaciones tienen entre 50 y 80% de riesgo a desarrollar cáncer de mama después de los 70 años⁴.

Agentes quimioterapéuticos: cisplatino

Los agentes quimioterapéuticos que tienen como blanco el ADN ha demostrado ser los más efectivos en la terapia clínica debido a que incrementan el tiempo de supervivencia del paciente con cáncer, desafortunadamente suelen ser extremadamente tóxicos. Por tal motivo, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar agentes mucho más selectivos para el tratamiento del cáncer y mucho menos tóxicos.

El cisplatino o cis-diaminodicloroplatino(II) (CDDP) es un medicamento basado en el elemento platino y es usado en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Cuando es administrado, uno de los grupos funcionales de cloro es desplazado por una molécula de agua, la cual permite que el átomo de platino se inserte en el ADN (Figura 7). En consecuencia, se produce la unión cruzada entre dos bases nitrogenadas del ADN y el desplazamiento del otro átomo de cloro. Esta unión covalente ocurre en las guaninas adyacentes en el surco mayor del ADN y como resultado dobla el ADN en este sitio. Esta distorsión del ADN favorece el acceso a proteínas de unión al ADN implicadas en la transcripción, como la proteína de unión a la caja TATA, TBP (del inglés TATA binding protein)

lo que resulta en la formación de un complejo ADN-proteína fuertemente unido, impidiendo de esta forma la síntesis del ADN⁴⁹.

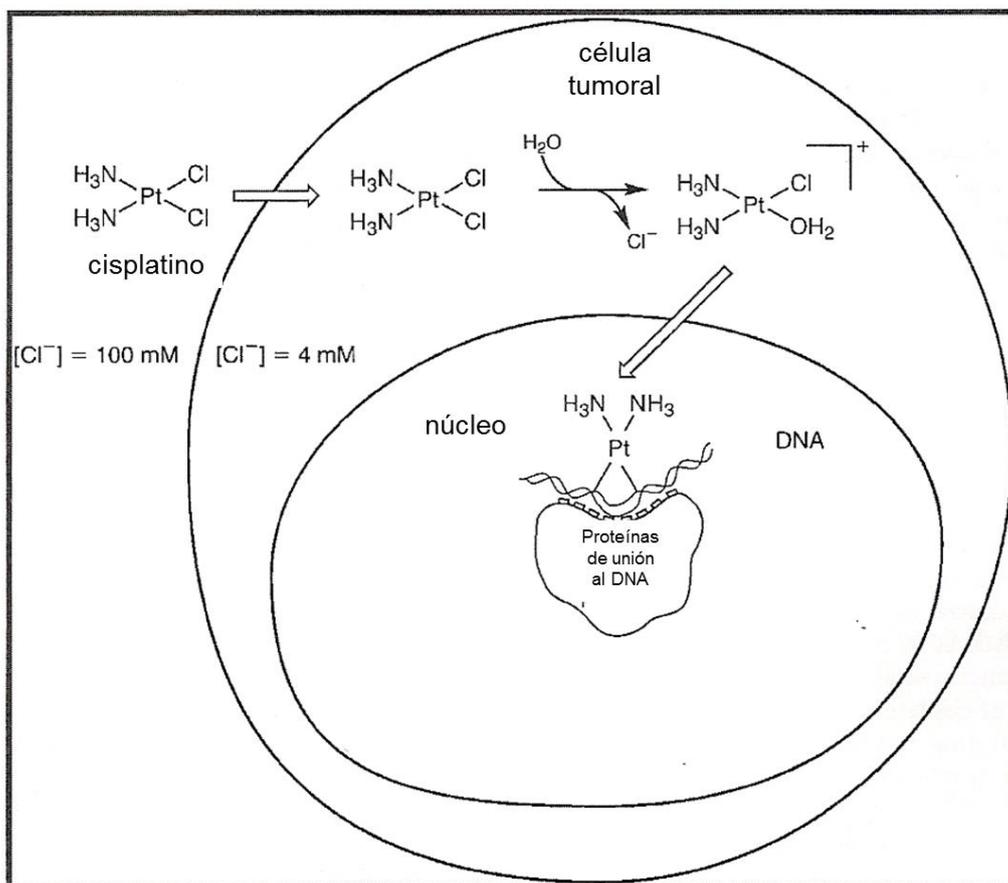


Figura 7. Mecanismo de acción del cisplatino (modificado de Hall MD, Alderden RA, Zhang M, Beale PJ, Cai Z, Lai B, Stampfl AP, Hambley TW. J Struct Biol. 2006).

ANTECEDENTES

Un estudio reciente demostró que la nicotinamida puede disminuir la proliferación celular y aumentar la apoptosis en células de leucemia crónica⁴⁷. Otro estudio demostró que la nicotinamida presenta efectos sinérgicos con valproato en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de páncreas MIAPaca-2, disminuyendo la viabilidad celular y promoviendo la apoptosis^{43,44}. Y también se ha demostrado que la nicotinamida tiene un efecto antiproliferativo en células de cáncer de próstata⁴⁵.

Por otro lado, también se ha reportado que la nicotinamida puede actuar como radiosensibilizador en combinación con carbógeno (95% oxígeno ±5% dióxido de carbono) en cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma escamoso⁴⁶.

Interesantemente, diversos estudios han sugerido que los compuestos capaces de inhibir la actividad de PARP-1 pueden ser particularmente útiles para el tratamiento del cáncer con mutaciones en BRCA1, solos o en combinación con agentes quimioterapéuticos y con radioterapia. Con base en estos antecedentes, el presente trabajo se enfocó en analizar el efecto de nicotinamida como inhibidor de PARP-1 en células de cáncer de mama deficientes de BRCA-1, como posible inductor de letalidad sintética.

JUSTIFICACIÓN

El aumento en la expresión de proteínas asociadas con los mecanismos de reparación del ADN, así como de su actividad, ocasiona resistencia a agentes antineoplásicos en células tumorales.

Las proteínas PARP-1 y BRCA1 están implicadas en el reconocimiento y reparación de daño al ADN, por lo que pueden ser blancos terapéuticos.

Investigar el efecto de nicotinamida sobre la inhibición de PARP-1, en un modelo deficiente para BRCA1, permitirá evaluar la sensibilización de células de cáncer de mama expuestas a agentes antineoplásicos y radioterapia.

HIPÓTESIS

La nicotinamida como inhibidor de PARP-1, sensibilizará a las células deficientes de BRCA1 a los efectos citotóxicos del cisplatino y radioterapia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la Nicotinamida, en combinación con cisplatino y radioterapia, en células de carcinoma mamario deficientes de BRCA1.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la nicotinamida sobre la actividad de PARP-1 *in vitro*.
2. Analizar el efecto de nicotinamida como inhibidor de PARP-1 en presencia de daño al ADN en las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 de carcinoma mamario.
3. Determinar la CI50 del tratamiento con nicotinamida y cisplatino en las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 de carcinoma mamario.
4. Analizar el efecto de la combinación nicotinamida y cisplatino en las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 de carcinoma mamario.
5. Determinar mediante curvas de sobrevida la DL50 de radiación ionizante en las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 de carcinoma mamario.
6. Determinar el efecto de nicotinamida como radiosensibilizador en las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 de carcinoma mamario expuestas a radiación ionizante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares derivadas de adenocarcinoma de mama: MDA-MB-436, MCF-7 y MDA-MB-231. Las células MDA-MB-436 presentan una mutación en el exón 20 de BRCA1 en la posición 5396 (+1G>A) clasificada como patogénica debido a que da como resultado una proteína truncada no funcional, mientras que MCF-7 expresa BRCA1 silvestre, pero en bajos niveles y MDA-MB-231 que expresa BRCA1 silvestre y en niveles normales.

Cultivos celulares.

El medio de cultivo utilizado para las líneas celulares fue Eagle modificado por Dulbecco con F12, pH de 7.4 (DMEM-F12, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Gibco) al 10% (v/v) y una solución comercial de antibióticos compuesta por 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA).

Ensayo de actividad para PARP-1 *in vitro* y con la proteína PARP-1 endógena en células MDA-MB-436.

El ensayo de actividad de PARP-1 *in vitro* se realizó mediante la incubación con diferentes dosis de nicotinamida (Sigma Aldrich) (50, 100, 200, 500, 750 y 1000 µM) durante una hora en presencia de una proteína recombinante PARP-1 como se utilizó sustrato NAD⁺ marcado. La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pozos con proteínas histonas acopladas al fondo de cada uno de los pozos y las cuales fueron el blanco de los polímeros de ADP-ribosa. Después del tiempo de

incubación se analizó la actividad de PARP-1 mediante un ensayo colorimétrico de Trevigen Universal (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA), de acuerdo a las especificaciones proporcionadas por el fabricante.

Para el ensayo con la proteína endógena se obtuvo un botón celular mediante tripzinización y posteriormente fue resuspendido en 50 μ l de Buffer PARP 1X (0.5 M NaCl, 1% de NP-40, 0.4 M PMSF e inhibidor de proteasa) y fue incubado en hielo por 30 min con agitación. Posteriormente fue centrifugado a 13,000 rpm por 10 min, y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford⁵². Se colocaron 30 μ g por muestra en una placa de 96 pozos por duplicado en presencia de Buffer de PARP 1X y coctel PARP durante 1h a temperatura ambiente en presencia de nicotinamida (50, 100, 200, 500, 750 y 1000 μ M). En seguida, se analizó la actividad de PARP-1 mediante un ensayo colorimétrico de Trevigen, con modificaciones. La actividad de PARP-1 fue calculada utilizando una curva estándar.

Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en portaobjetos y 24 h después se agregaron las diferentes dosis de nicotinamida (0.5, 0.75, 1.5, y 10 mM). Como control positivo se indujo daño al ADN con 10mM de H₂O₂ por 10 min y a continuación las células se fijaron con paraformaldehído por 10 min. Después se permeabilizaron y se bloquearon con una solución de suero fetal de caballo al 10%, albumina al 15% y SFB al 1% en PBS por 1 h. El anticuerpo primario anti-pADPr (dilución 1:75, clona H10 de Santa Cruz) fue incubado toda la noche a 4°C. En seguida se incubó por 1h con un anticuerpo secundario acoplado con Alexa Fluor-488 (dilución 1:500; anti-ratón, Invitrogen). Las laminillas fueron montadas con ProLong Gold antifade

reagent con 4,6-diamino-2-fenilindola (DAPI) (Invitrogen, Molecular Probes, Oregon, USA). Y fueron visualizadas en un microscopio confocal multifotón laser 780 NLO, Carl Zeiss (Hamburgo, Alemania).

Ensayo de proliferación celular

Se sembraron 2×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos a 37°C , con una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 y posteriormente fueron tratadas con diferentes dosis de nicotinamida (0, 1, 10 y 30 mM) durante 1, 3 y 6 días. Después del tiempo de incubación se agregaron 10 μl de la solución CCK-8 (kit comercial Cell Counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Inc. USA) y se incubaron durante 4 h a 37°C y una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 . Finalmente se leyó la placa en modo absorbancia a 450 nm, usando un lector de ELISA. Los datos fueron normalizados mediante una curva patrón en donde el número de células era conocido.

Análisis de la viabilidad celular

Se sembraron 9×10^4 células en cajas de 24 pozos a 37°C , con una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 , y posteriormente fueron tratadas con diferentes dosis de nicotinamida y cisplatino para determinar la CI50 (Concentración Inhibitoria) con cada uno de los tratamientos. Después de tres días de incubación con nicotinamida y 24 h con cisplatino las células se fijaron con formaldehído al 10% toda la noche a 4°C . A continuación fueron teñidas con cristal violeta al 0.05% y finalmente se agregó ácido acético al 33% y se colocaron durante 15 min en agitación después se leyó la placa en el lector de ELISA a 570 nm. La cantidad de cristal violeta es proporcional a las células que fueron fijadas y, que por

consiguiente, eran viables al final del tratamiento. Finalmente, la IC50 de cada tratamiento fue determinada mediante el programa Sigma Plot 10.0.

Ensayo clonogénico

Se sembraron 2.5×10^5 células MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 en botellas de cultivo con una superficie de 25 cm^2 a 37°C , con una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 . Después de 24 h de incubación fueron expuestas a diferentes dosis de radiación 0.5, 1 y 1.5 Gy para las células MDA-MB-436, 2, 4 y 6 Gy para la línea MDA-MB-231 y para las células MCF-7 fue 1, 3 y 5 Gy con el equipo Theraton Phoenix (fuente de poder Cobalto 60). Después de la radiación se obtuvo un botón celular mediante el método de tripzincación y se sembraron 1,000 células irradiadas en cajas p60 por 24 y 14 días, dependiendo del tiempo de duplicación celular de cada una de las líneas celulares. Posteriormente, se fijaron y se tiñeron las colonias formadas con formaldehído al 10 % y finalmente, se contaron las colonias formadas con 50 células en un microscopio estereoscópico Leica. A continuación se determinó la DL50 (Dosis Letal) para posteriormente analizar el efecto de la combinación nicotinamida y radiación ionizante mediante estos mismos ensayos. Los resultados se expresaron en porcentaje de supervivencia⁵⁸.

Silenciamiento de PARP-1 mediante RNAs de interferencia

Las células MDA-MB-436 fueron sembradas en cajas de 6 pozos a una confluencia de 1.5×10^5 en 2 ml de medio Optímim y después de 24 h fueron transfectadas con lipofectamina RNAiMAX y RNA de interferencia (siRNA) específico para PARP-1 (Ambrion. Cat#4390824). El control negativo fue lipofectamina RNAiMAX con siRNA inespecífico (Ambrion. Cat#4390844).

Después de 24 h de exposición a los siRNAs las células fueron tratadas 24 h con cisplatino, transcurrido este tiempo el medio fue reemplazado con medio nuevo por otras 24 h. Las células fueron cultivadas a 37°C con una atmosfera húmeda que contenía 5% de CO₂. Finalmente, después de 72 h de tratamiento el medio fue aspirado y se analizó la viabilidad celular mediante un ensayo con cristal violeta, como se describió anteriormente. Para comprobar el efecto inhibitorio de los siRNAs analizamos los niveles de la proteína PARP-1 mediante western blot.

Extracción de proteínas

Después de las 72 h de tratamiento con los siRNAs y cisplatino se obtuvo el botón de las células MDA-MB-436 mediante tripzinación. A continuación los botones celulares fueron resuspendidos en 100µl de buffer de lisis para la extracción de proteínas mediante el método de RIPA (RadiolImmunoPrecipitation Assay, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, NaCl₂, Tris 50mM) se adicionó un inhibidor de proteasas PMSF (1mM) y 1X de cocktail de inhibidor de proteasas (# Cat. P8340, Sigma-Aldrich). La concentración de proteínas de cada uno de los lisados se cuantifico mediante el método el método de Bradford⁵² y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Western blot.

Se tomó el volumen equivalente a 60µg de proteínas por muestra y se mezclaron en un tubo con buffer desnaturizante (Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, 150mM de β-mercaptoetanol, 150mM de Ditrioteitol, 1% de azul de bromofenol y 30% de glicerol) y se colocaron en ebullición durante 7 min. Las muestras se cargaron en un gel desnaturizante al 10% (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) y

posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno o PVDF con un poro de 0.22 μm . Para confirmar la transferencia de las proteínas a la membrana ésta se tiñó con Rojo de Ponceau (# Cat. P7170, Sigma-Aldrich) y se incubó en la solución de bloqueo (Tween-TBS 0.1% y 5% de leche baja en grasas, TTBS) durante toda la noche. Después del bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-PARP-1 (1:1000) (Cell Signaling), y anti-actina (Santa Cruz, Biotechnology) en TTBS toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados de 25 min y posteriormente se re-incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:1000) y anti-ratón (1:1000) (Santa Cruz, Biotechnology), respectivamente, ambos acoplado a peroxidasa de rabano durante una hora a temperatura ambiente, después se realizaron tres lavados de 20 min con TTBS y finalmente las proteínas fueron visualizadas mediante un sustrato quimioluminiscente (Immunodetect, Millipore) en el equipo CDigit Scanner Odyssey CLx (Licor, Lincoln, Nebraska USA).

Análisis del sinergismo

El análisis de sinergismo se realizó mediante el método Chou Talalay, el cual permite la identificación de las interacciones entre dos fármacos, independientemente del mecanismo de acción de los fármacos individuales. El análisis del sinergismo fue determinado mediante el cálculo del “índice de combinación” (IC) usando la siguiente ecuación:

$$CI_x = (D1/Dx1) + (D2/Dx2) + a(D1)(D2)/(Dx1)(Dx2)$$

Donde CI_x representa el valor de IC para un efecto citotóxico en relación al crecimiento celular, $Dx1$ y $Dx2$ representan las dosis de los fármacos 1 y 2 requeridos de manera individual para ejercer un efecto citotóxico, $D1$ y $D2$ representan las dosis de los agentes 1 y 2 que inducen el mismo efecto citotóxico

en combinación con el otro agente, respectivamente. La variable “a” indica el tipo de interacción: a=0, fármacos con el mismo mecanismo de acción, a=1 para un mecanismo de acción diferente; en este caso se utilizó la variable a=1. Un IC de 1 indica un efecto aditivo, un IC <1 un efecto sinérgico y un IC > un efecto antagónico. Los datos de la ecuación fueron obtenidos mediante el programa Sigma Plot versión 10.0

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianzas (ANOVA) y las diferencias estadísticas entre grupos se establecieron por la prueba de Bonferroni utilizando el programa computacional GraphPad Prism versión 5. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.001$.

RESULTADOS

La nicotinamida inhibe la actividad de PARP-1 in vitro y de la proteína PARP-1 endógena en células MDA-MB-436.

La nicotinamida, un producto de la catálisis de NAD^+ actúa como un inhibidor natural de PARP-1 *in vitro* y la mayoría de los inhibidores de PARP-1 se basan en su farmacóforo²³. Sin embargo, no existen evidencias de su efecto como inhibidor de PARP-1 en células tumorales.

Para comprobar el efecto de nicotinamida como inhibidor de PARP-1 primero se analizó la actividad de PARP-1 *in vitro* con diferentes concentraciones de nicotinamida (50 a 1000 μM) en presencia de NAD^+ marcado, el cual se utilizó como sustrato para la reacción, y una proteína PARP-1 recombinante. Después de 1 h de incubación se analizaron los niveles de actividad de PARP mediante

una reacción colorimétrica. Como podemos observar en la figura 1 la actividad de PARP-1 disminuyó significativamente a partir de 500 μM .

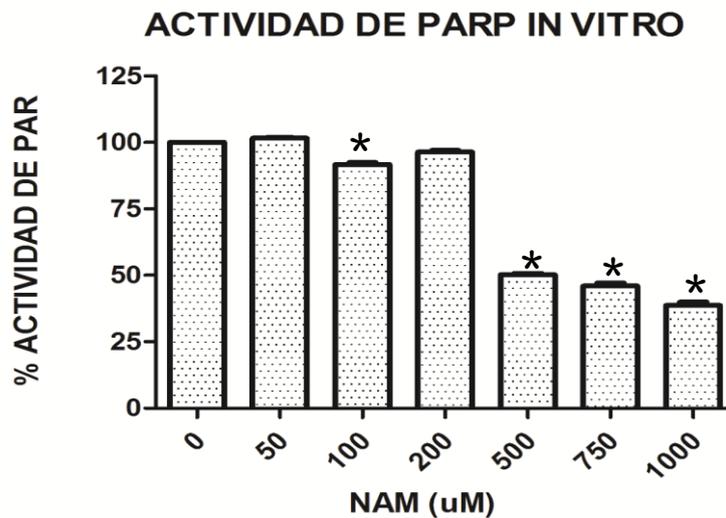


FIGURA 1. Efecto de la nicotinamida (NAM) sobre la actividad de PARP-1 *in vitro*. Para determinar el efecto de NAM sobre la ADP-ribosilación, se incubó la enzima recombinante PARP-1 por 1 h con diferentes concentraciones de NAM. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante una prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Bonferroni * $p < 0.001$.

A continuación, se determinó el efecto de nicotinamida como inhibidor de la actividad de PARP-1 endógena en células MDA-MB-436 de carcinoma mamario deficientes de BRCA1 mediante una modificación del ensayo de actividad de PARP-1 *in vitro*³⁵. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de nicotinamida de 500 a 1000 μM durante una hora y posteriormente se analizó la actividad de PARP-1. Como podemos observar en la figura 2 la nicotinamida disminuye significativamente la actividad de PARP-1 en las células tratadas a

partir de 500 μ M. Como control positivo del experimento se utilizó el inhibidor de PARP-1, 3-aminobenzamida (3-AB) ampliamente reportado.

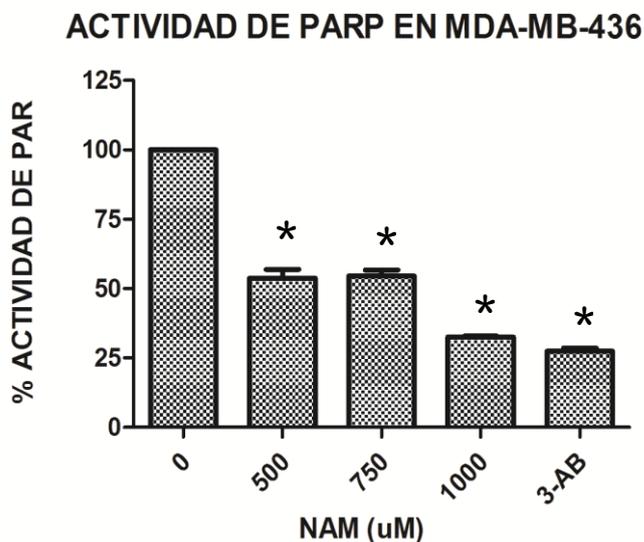


FIGURA 2. Efecto de la NAM sobre la actividad endógena de PARP-1. Para determinar el efecto de NAM como inhibidor de la ADP-ribosilación se utilizaron extractos de células MDA-MB-436 deficientes de BRCA1 con diferentes concentraciones de NAM. Como control positivo se utilizó el inhibidor de PARP-1, 3-aminobenzamida (3-AB). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante una prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Bonferroni * $p < 0.001$.

La nicotinamida inhibe la formación de polímeros de ADP-ribosa en presencia de daño al ADN.

Posteriormente, se analizó si el daño al ADN inducido por H_2O_2 es capaz de inducir la actividad de PARP-1 y por lo tanto, de activar la maquinaria de reparación del ADN dañado. Para ello, se trataron células de cáncer de mama MDA-MB-436 (deficientes de BRCA-1), MCF-7 (bajos niveles de BRCA-1) y MDA-MB-231 (proficiente de BRCA1) con H_2O_2 a 10 mM durante 10 min y se analizó la activación de PARP-1 por inmunofluorescencia del polímero de poli (ADP-ribosa,

verde). Como podemos observar en la figura 3 la superposición de las imágenes muestran que H₂O₂ induce la formación de PAR en los núcleos, y el pretratamiento con nicotinamida contrarresta la activación de PARP-1 inducida por H₂O₂ de forma dosis dependiente.

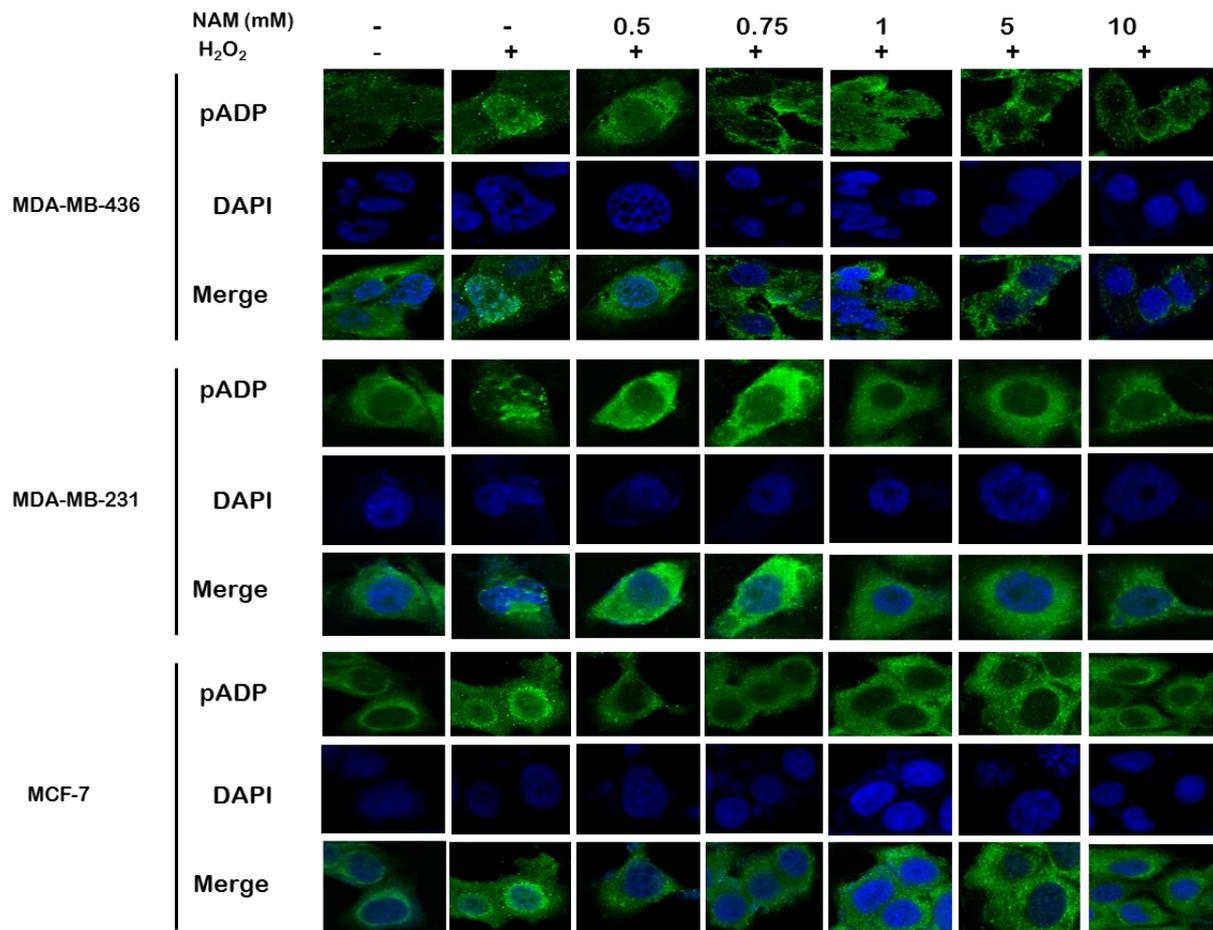


FIGURA 3. Efecto de NAM sobre la formación de polímeros de ADP-ribosa (PAR) (verde) dentro del núcleo en presencia de daño al ADN. El efecto de NAM fue determinado por inmunofluorescencia en células MDA-MB-436 (deficientes de BRCA1), MDA-MB-231 (BRCA1 silvestre), y MCF-7 (bajos niveles de BRCA1) de cáncer de mama. Las células fueron expuestas a diferentes dosis de NAM durante 1 h previa a la exposición de H₂O₂ (10 mM). Los núcleos fueron marcados con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (azul). Las células se cultivaron sobre laminillas y fueron fijadas 10 min después del tratamiento con H₂O₂.

El tratamiento con nicotinamida reduce la proliferación de las células MDA-MB-436.

Se ha observado en estudios preclínicos y clínicos de fase I que los inhibidores de PARP-1 pueden usarse como monoterapia contra el cáncer debido a que inducen muerte selectiva de células tumorales con defectos en vías de reparación del ADN, específicamente aquellas con mutaciones en los genes de BRCA1 y BRCA2⁴⁻⁶. Por lo que en este trabajo se analizó el efecto de la nicotinamida en la viabilidad de las células epiteliales de cáncer de mama MDA-MB-436 a partir de 1 día de tratamiento y hasta 6 días de exposición. Como podemos observar en la figura 4 la viabilidad celular disminuyó significativamente después de tres días de exposición con 30 mM de nicotinamida (Figura 4).

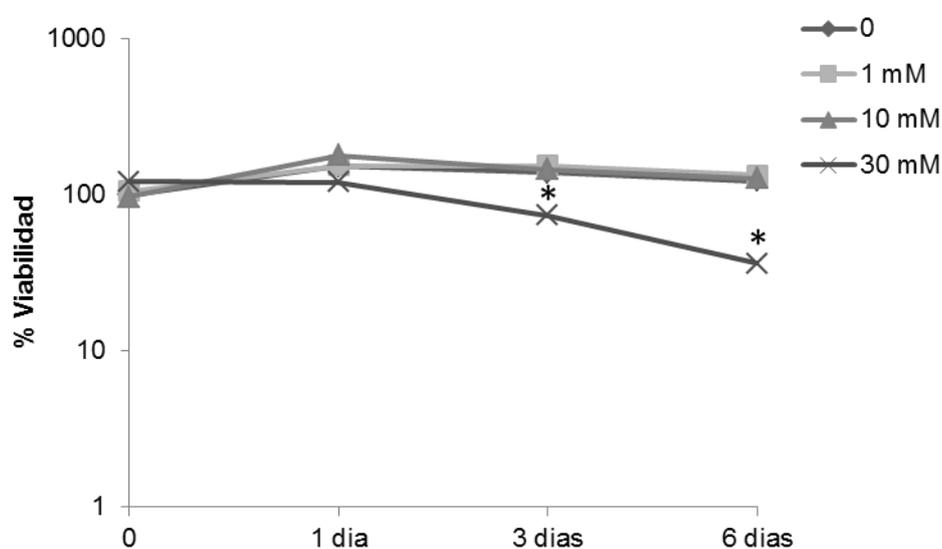


FIGURA 4. Análisis del efecto de diferentes concentraciones con NAM sobre la proliferación de células MDA-MB-436, mediante el método CCK-8.

El tratamiento con nicotinamida y cisplatino inhiben la viabilidad celular de células de carcinoma mamario.

Posteriormente, se determinó si el efecto de nicotinamida sobre la viabilidad de las células MDA-MB-436 es dependiente del estado de BRCA1. Para ello, analizamos otras dos líneas celulares de carcinoma mamario con diferentes estados de BRCA1, MCF-7 la cual presenta bajos niveles de BRCA1 y MDA-MB-231, con niveles normales de BRCA1. Dichas células fueron expuestas 72 h a diferentes dosis de nicotinamida y después del tiempo transcurrido fueron analizadas mediante un ensayo con cristal violeta. Como podemos observar en la figura 5A la nicotinamida disminuye significativamente y de manera dosis dependiente la viabilidad celular en las tres líneas tumorales. A continuación, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI50) con nicotinamida en la cual hay un 50% de muerte celular en cada una de las líneas tumorales con el programa Sigma Plot 10.0. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1 de resultados.

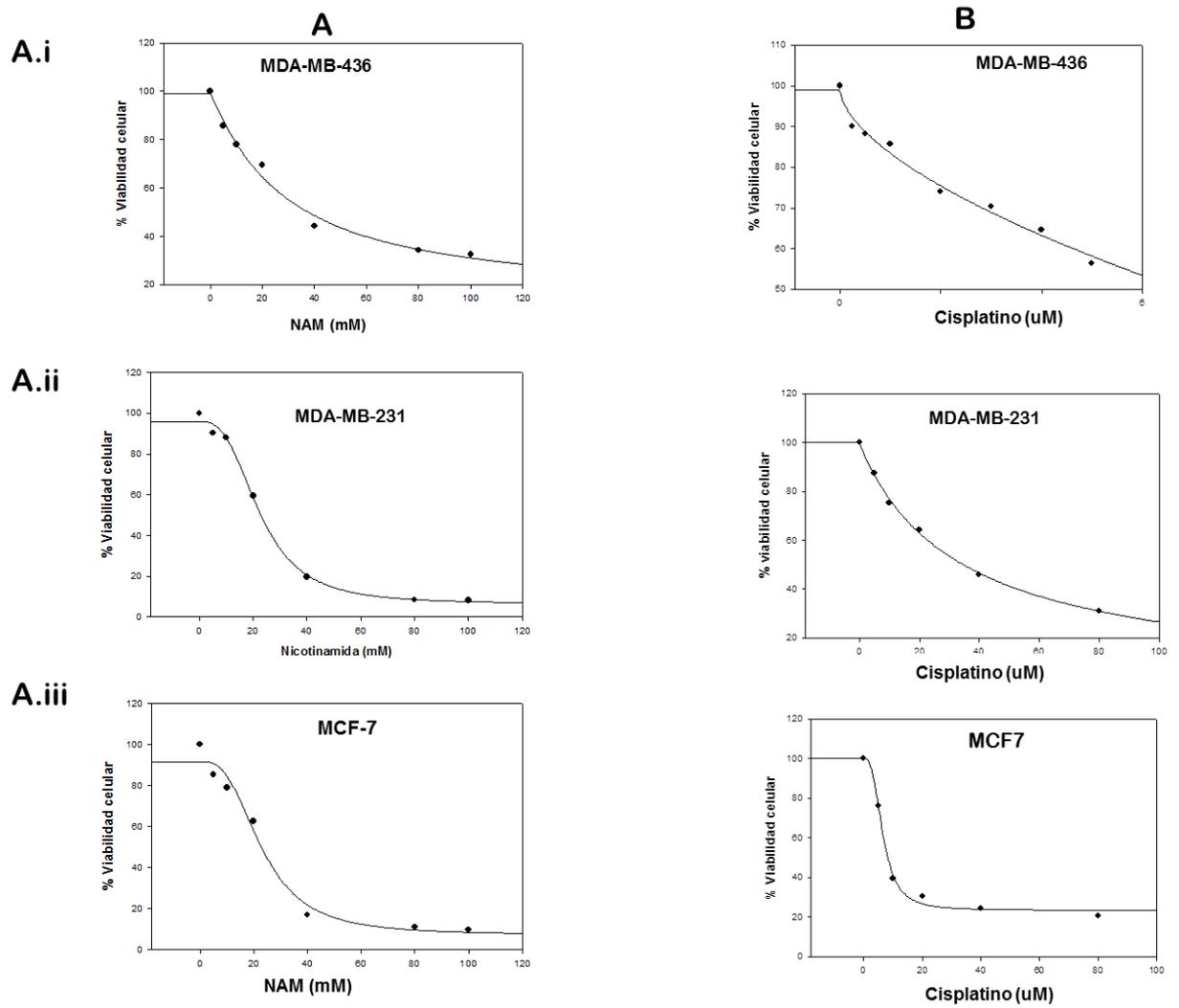


FIGURA 5. Efecto de la NAM y cisplatino sobre la viabilidad celular. Se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar la CI50 con NAM después de 72 h de tratamiento (A) y 24 h con cisplatino (B) en células MDA-MB-436 (deficientes de BRCA1), MDA-MB-231 (BRCA1 silvestre), y MCF-7 (bajos niveles de BRCA1) mediante el programa Sigma Plot 10.0.

Tabla 1. Determinación de la concentración inhibitoria (CI50) con nicotinamida en tres líneas celulares de cáncer de mama.

Línea celular	Nicotinamida CI50 (mM)	Cisplatino CI10 (μ M)
MDA-MB-436	30.09	0.5
MDA-MB-231	20.09	5
MCF-7	20.01	4

En la actualidad el tratamiento con cisplatino es utilizado como “tratamiento de primera línea” en pacientes con cáncer de mama, sin embargo presenta severos efectos secundarios ²⁸.

Con base en estos antecedentes, se analizó el efecto de cisplatino en la viabilidad de las líneas tumorales MDA-MB-436, MDA-MB-436 y MCF-7 mediante un ensayo con cristal violeta. Las células fueron expuestas 24 h a cisplatino y transcurrido este tiempo se incubaron 24 h más con medio solo. Como podemos observar en la figura 5B los niveles de viabilidad celular disminuyeron de manera dosis dependiente en cada una de las líneas tumorales. A continuación, a partir de estas curvas se determinó la CI20 para cada una de las líneas de cáncer de mama mediante el programa Sigma plot 10.0 para su posterior combinación con nicotinamida. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1 de resultados.

Efecto de nicotinamida como sensibilizador al tratamiento con cisplatino en células de carcinoma mamario.

Por otro lado, se ha demostrado que los inhibidores de PARP pueden actuar como sensibilizadores a la quimioterapia y radioterapia en diferentes tipos de cáncer²⁸. Otros reportes han demostrado que los inhibidores de PARP-1 (PJ34 y BS1-201) pueden potenciar los efectos citotóxicos de compuestos derivados del platino que tiene como blanco inducir daño al ADN³.

Para ello utilizamos los valores calculados para la CI20 con cisplatino en combinación con diferentes dosis de nicotinamida (5-40 mM) por 72 h (tres días) de tratamiento. El tratamiento fue administrado de la siguiente manera: después de 24 h de exposición con nicotinamida (día uno) el medio fue complementado con nicotinamida más cisplatino por 24 h (día dos) y transcurrido este tiempo el medio fue sustituido nuevamente con nicotinamida por 24 h más (día tres). Como se observa en la figura 6 la combinación nicotinamida con cisplatino disminuyó significativamente la viabilidad celular a partir de 10 mM de nicotinamida en las tres líneas de carcinoma mamario.

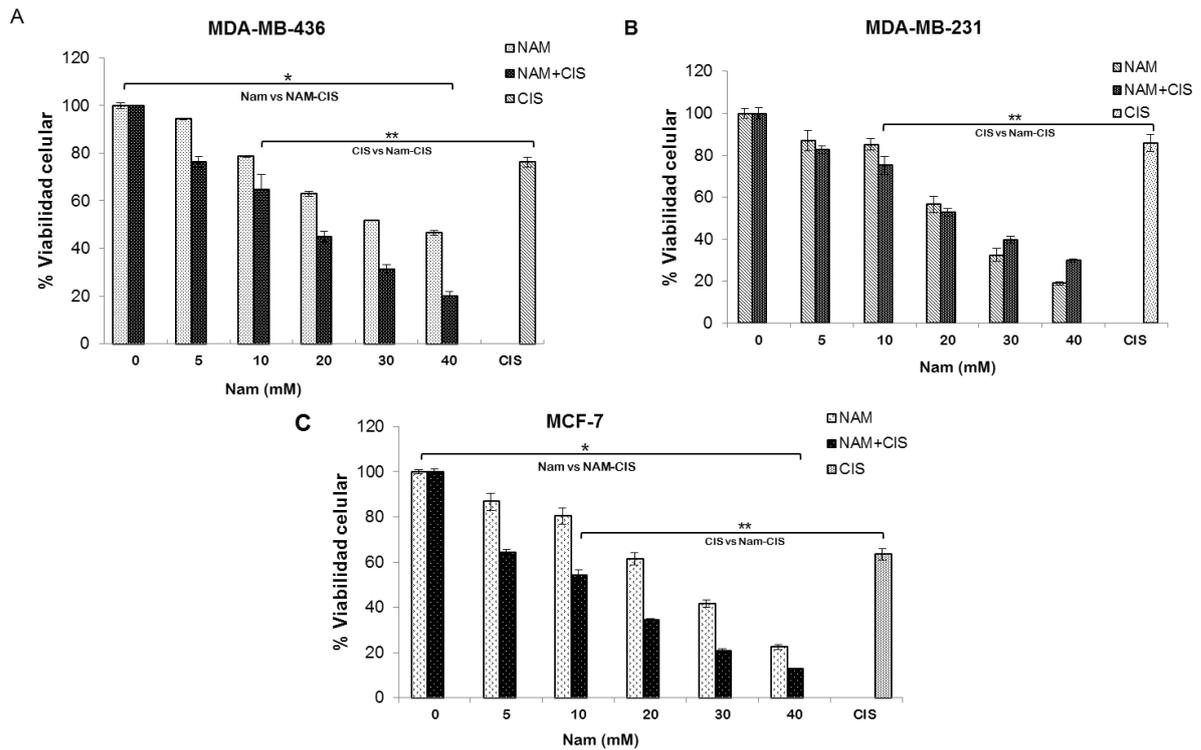


FIGURA 6. Efecto de NAM, en combinación con cisplatino, sobre la viabilidad de células MDA-MB-436 (deficientes de BRCA1, A), MDA-MB-231 (BRCA1 silvestre, B), y MCF-7 (bajos niveles de BRCA1, C). Las células fueron tratadas con diferentes dosis de NAM por 72 h y Cisplatino (CIS) por 24 h. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con respecto a NAM vs NAM-CIS ($p < 0.001$). ** Diferencias significativas con respecto a CIS vs NAM-CIS ($p < 0.001$). El nivel de significancia fue calculado mediante la prueba de ANOVA de dos vías y comparación múltiple Bonferroni.

Con el fin de determinar el efecto sinérgico de la combinación nicotinamida y cisplatino los datos fueron analizados mediante método de Chou-Talalay, el cual indica el tipo de interacción entre dos fármacos con diferentes mecanismos de acción a través del análisis de isoblograma. Como se puede observar en la Tabla 2 el análisis demostró que la combinación nicotinamida y cisplatino produce un efecto sinérgico antiproliferativo en las células MDA-MB-436 y MCF-7.

TABLA 2. Efecto sinérgico entre la nicotinamida y el cisplatino en las células MDA–MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 calculado mediante el método Chou-Talalay.

Línea celular	Dosis (mM)		Drogas solas		Efecto de la combinación	Índice de combinación	Interacción
	Drogas en combinación		Nicotinamida	Cisplatino			
	Nicotinamida (D1)	Cisplatino (D2)	Nicotinamida (Dx1)	Cisplatino (Dx2)	(X%) ^a	(Cix) ^b	
MDA-MB-436	5	0.0005	11.1	0.0018	76	0.73	sinergismo
	10	0.0005	18.65	0.0041	64	0.66	sinergismo
	20	0.0005	39.14	0.11	45	0.52	sinergismo
	30	0.0005	121	0.12	31	0.25	sinergismo
MDA-MB-231	40	0.0005	122	0.13	19	0.33	sinergismo
	5	0.005	7.33	0.0082	82	1.29	
	10	0.005	10.03	0.0133	75	1.37	
	20	0.005	20.27	0.0345	52	1.13	
MCF-7	30	0.005	28.35	0.0516	39	1.16	
	40	0.005	35.9	30.03	30	1.28	
	5	0.004	14.34	0.0055	64	1.08	
	10	0.004	19.73	0.0082	54	0.99	
MCF-7	20	0.004	34.28	0.0166	34	0.82	sinergismo
	30	0.004	51	0.15	20	0.62	sinergismo
	40	0.004	66	0.2	12	0.63	sinergismo

“Índices de Combinación (Cix) de los efectos farmacológicos de la Nicotianamida y el Cisplatino en tres líneas celulares de cáncer de mama, con base en el método de Chou-Talalay⁵⁶”

Efecto del RNA de interferencia para PARP-1 en células MDA-MB-436.

Con el fin de comprobar si la disminución en los niveles de viabilidad celular se debía al efecto de nicotinamida como inhibidor de PARP-1 específicamente, utilizamos un siRNA específico para PARP-1 en células MDA-MB-436. Como podemos observar en la figura 7 la depleción de PARP-1 disminuyó ligeramente la viabilidad celular después del tratamiento con cisplatino.

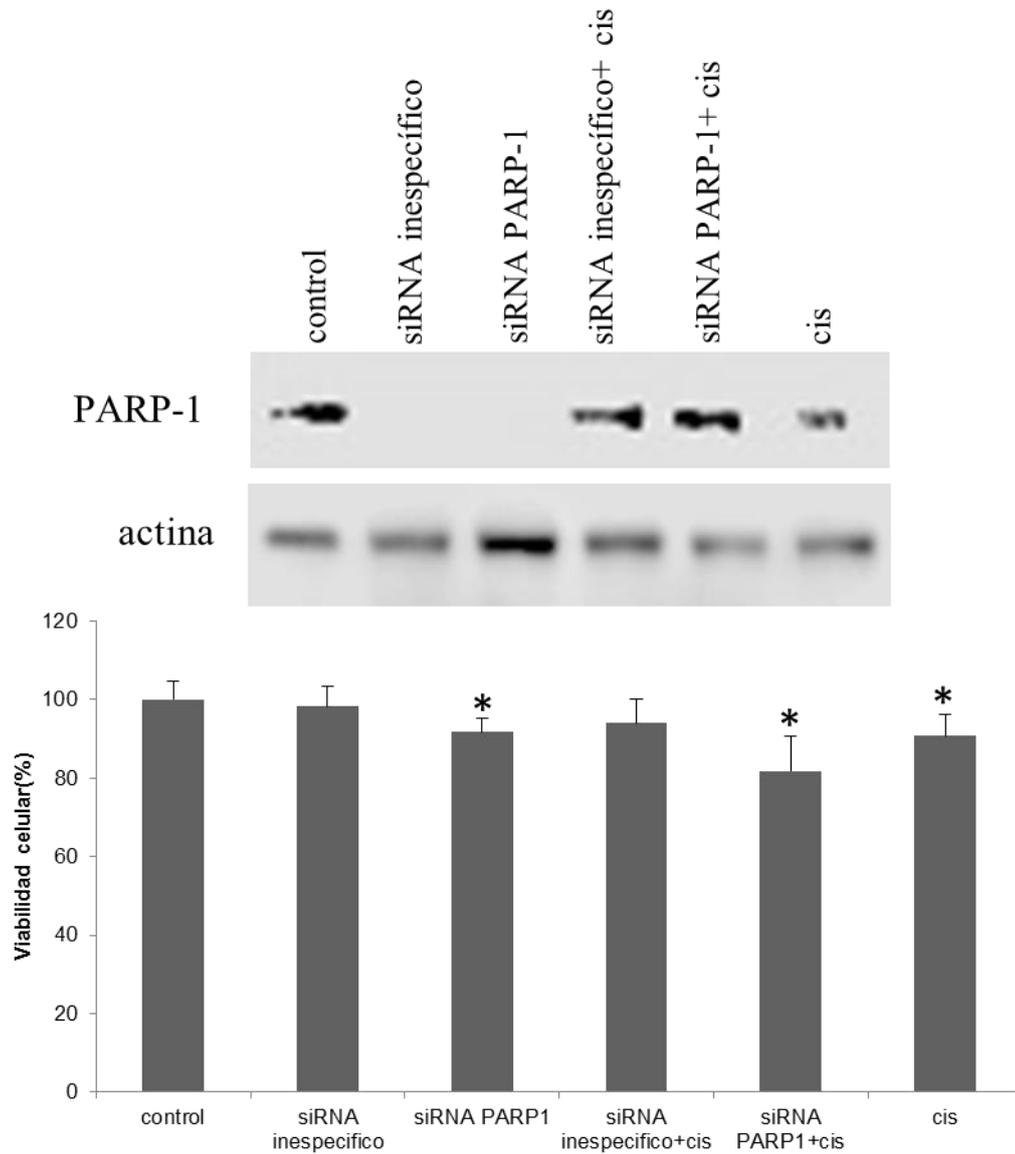


FIGURA 7. Efecto del RNA de interferencia (siRNA) específico para PARP-1 en células MDA-MB-436. Las células fueron tratadas con siRNA para PARP-1, como control negativo se utilizó un siRNA inespecifico y cisplatino (cis). El análisis de la viabilidad celular fue determinado mediante un ensayo de cristal violeta. *Diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.001$). El nivel de significancia fue calculado mediante la prueba de ANOVA de dos vías y comparación múltiple Bonferroni.

Efecto de nicotinamida como radiosensibilizador en células de cáncer de mama.

En los primeros estudios realizados con el inhibidor de PARP-1, 3-aminobenzamida se observó que podía potenciar la sensibilidad a la radiación ionizante por inhibición de la poli-(ADP-ribosilación)⁵⁵. Más tarde otro estudio demostró que la nicotinamida también podía aumentar la eficiencia de la radioterapia en carcinoma de vejiga⁵⁷. Sin embargo, no existen ninguna evidencia en cáncer de mama.

Para determinar la sensibilidad de las células deficientes de BRCA1 (MDA-MB-436), con bajos niveles de BRCA1 (MCF-7) y proficientes de BRCA1 (MDA-MB-231) a la radiación ionizante, utilizamos ensayos de formación de colonias (CFA). Para ello, primero, se realizaron curvas de supervivencia celular para determinar cuál era la Dosis Letal (DL50). La DL50, se define como la dosis de radiación (medida en Greys [Gy]) necesaria para inducir el 50% de la muerte celular.

Como se puede observar en la figura 8 las tres líneas celulares de cáncer de mama mostraron diferentes niveles de sensibilidad a la radiación ionizante, siendo las células MDA-MB-436 las más sensibles a la radiación ionizante en comparación con las células MDA-MB-231. Y cabe resaltar que las células MCF-7 resultaron ser las más resistentes.

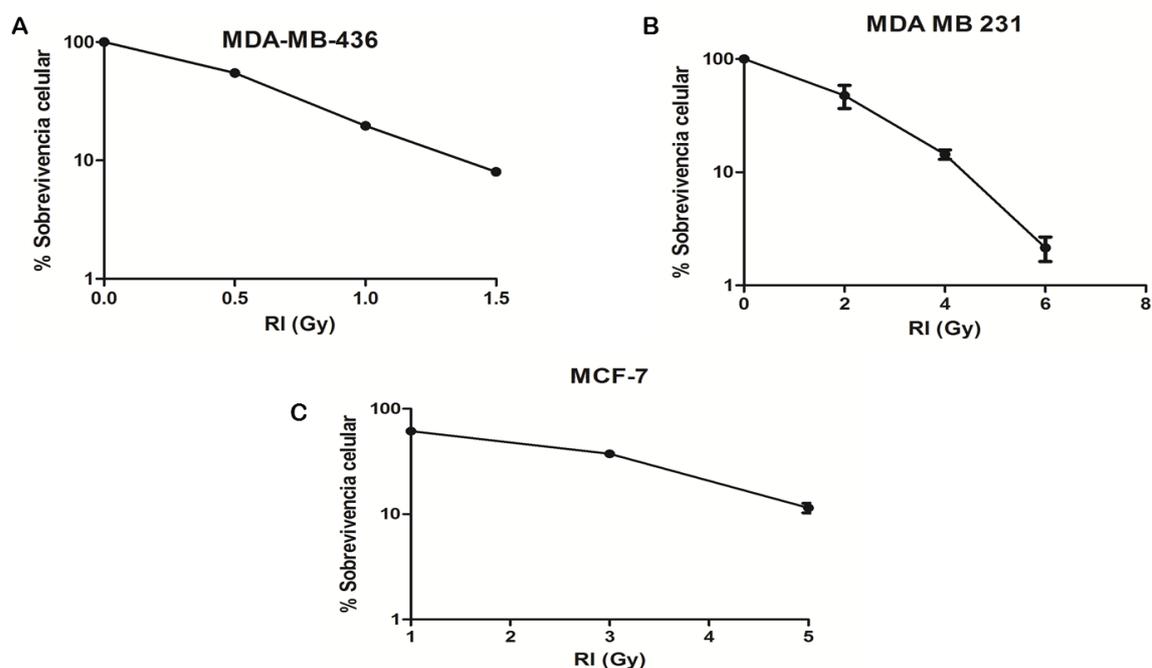


FIGURA 8. Curvas de sobrevida. Para determinar la dosis letal (DL) en las líneas celulares MDA-MB-436 (deficientes de BRCA1, A), MDA-MB-231 (BRCA1 silvestre, B), y MCF-7 (bajos niveles de BRCA1, C) después de la exposición a diferentes dosis de radiación ionizante (RI. Unidades en grey [Gy]) con el equipo Theratron Phoenix Co60. Las células MDA-MB-231 y MCF7 fueron incubadas por 14 días mientras que las células MDA-MB-436 se incubaron por 24 días. Los resultados se expresan en porcentaje de sobrevivencia celular.

A continuación con los datos obtenidos para la DL50 de cada una de las líneas celulares se evaluó el efecto de la nicotinamida en combinación con radiación ionizante. Los resultados demostraron que la nicotinamida disminuye significativamente la sobrevivencia celular de las células MDA-MB-436 y MDA-MB-231 comparadas con los controles expuestos solo a radiación ionizante. Interesantemente, se observó que las células MCF-7 no mostraron diferencias significativas aun con la concentración más alta de nicotinamida (Figura 9).

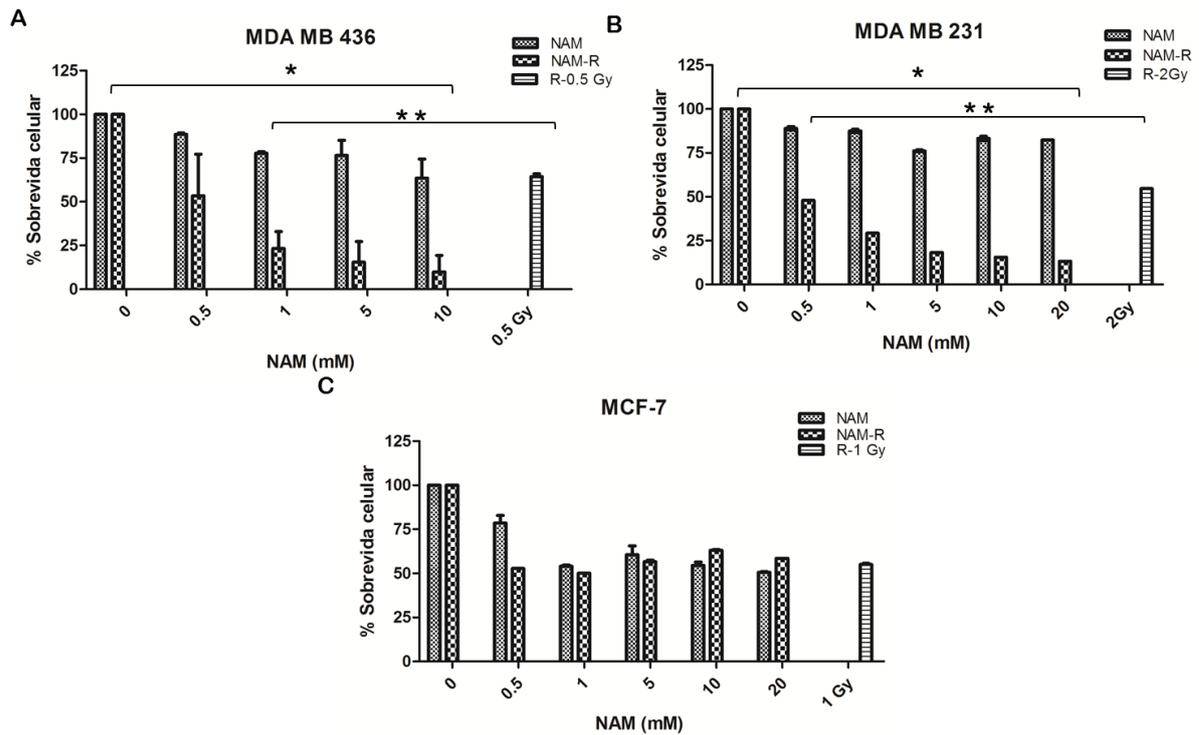


FIGURA 9. Efecto de NAM como sensibilizador a la radiación ionizante. Las células MDA-MB-436 (deficientes de BRCA1, A), MDA-MB-231 (BRCA1 silvestre, B), y MCF-7 (bajos niveles de BRCA1, C) fueron tratadas con diferentes concentraciones de nicotinamida (NAM) por 72 h en combinación con radiación ionizante (NAM-R). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. *Diferencias significativas entre NAM vs NAM-R ($p < 0.001$). ** Diferencias significativas con respecto a R vs NAM-R ($p < 0.001$). El nivel de significancia fue calculado mediante una prueba de ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple Bonferroni.

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la nicotinamida inhibe el crecimiento de las líneas celulares de carcinoma mamario MDA-MB-463, MDA-MB-231 y MCF-7 de manera dosis dependiente. También se observó que la depleción de PARP-1 mediante siRNAs reduce la viabilidad de las células deficientes de BRCA1. Nuestros resultados también demostraron que la nicotinamida incrementa los efectos citotóxicos del tratamiento con cisplatino y de la radiación ionizante en las células MDA-MB-436, MCF-7 y MDA-MB-231 de carcinoma mamario.

En la actualidad existe un numeroso grupo de inhibidores de PARP-1 que están siendo evaluados en estudios preclínicos como monoterapia o en combinación con agentes alquilantes o radioterapia. Sin embargo, el tiempo de desarrollo para estos fármacos es muy extenso en la mayoría de los casos debido a los estudios farmacocinéticos que se deben realizar para determinar qué tan seguro es el fármaco para el paciente, su eficacia y las dosis máximas toleradas, lo que genera un alto costo para poder llevar a cabo todos estos estudios que se requieren. En este sentido, el reposicionamiento farmacéutico de medicamentos utilizados en otros padecimientos y que podrían tener una actividad antitumoral podrían ser una buena alternativa mucho más rápida de utilizar para el paciente con cáncer.

Un ejemplo de ello es la nicotinamida, la cual se reportó como uno de los primeros inhibidores de PARP-1 sin embargo, su efecto como agente antitumoral no ha sido evaluado. La nicotinamida ha sido utilizada ampliamente en diferentes padecimientos dermatológicos, metabólicos y desordenes psiquiátricos⁴¹.

Algunos estudios en cáncer han demostrado que la nicotinamida puede utilizarse en combinación con radioterapia acelerada y carbógeno (ARCON) como radiosensibilizador⁴⁵⁻⁴⁶. El presente estudio demostró que la nicotinamida inhibe la actividad de PARP-1 *in vitro*, y estos resultados concuerdan con reportes previos^{23, 38}. Nosotros también observamos que la nicotinamida inhibe la actividad de PARP-1 endógena en células deficientes de BRCA1, MDA-MB-436.

PARP-1, es una proteína nuclear que actúa como un sensor de daño al ADN. Cuando ocurre un daño al ADN, PARP-1 se activa y se une al sitio dañado en donde adiciona largas ramificaciones de polímeros de (ADP-ribosa) sobre

diferentes proteínas como histonas, factores de transcripción y la propia PARP-1, permitiendo la relajación de la cromatina y con ello el reclutamiento de proteínas implicadas en la reparación del ADN. En este sentido nuestros resultados demostraron que la nicotinamida inhibe la ADP-ribosilación en presencia de daño al ADN inducido por H₂O₂ de manera dosis dependiente en las líneas MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MCF-7 de cáncer de mama, lo que sugiere que la nicotinamida bloquea la reparación del ADN a través de la inhibición de PARP-1. Este resultado fue observado en las tres líneas tumorales de cáncer de mama, lo que sugiere un efecto independiente del estado de BRCA1.

A continuación, analizamos si la inhibición de PARP-1 por nicotinamida o mediante siRNA específico para PARP-1 tiene algún efecto sobre la viabilidad celular, nuestros resultados demostraron que ambas condiciones experimentales reducen la viabilidad celular.

Por otro lado, se ha reportado que la inhibición de PARP-1 puede potenciar los efectos de agentes antineoplásicos como compuestos de platino, temozolomida y ciclofosfamida en células deficientes de BRCA¹⁰. Otro estudio demostró que el inhibidor de PARP-1, AZD2281, en combinación con cisplatino tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento celular de células deficientes de BRCA2⁴⁹. Estos reportes concuerdan con nuestros resultados en donde observamos que la nicotinamida en combinación con cisplatino disminuye significativamente la viabilidad celular en las tres líneas de carcinoma mamario independientemente del estado de BRCA1. Lo que sugiere que la nicotinamida induce letalidad sintética en células de cáncer de mama deficientes de BRCA1 como en el caso de los otros inhibidores de PARP-1 anteriormente reportados.

La inactivación de la reparación de RCS por inhibidores de PARP-1 durante la fase S induce a la formación de RDC y con ello confieren sensibilidad a agentes quimioterapéuticos y radiación ionizante ⁵. Nuestros resultados demostraron que la nicotinamida actúa como un radiosensibilizador en células deficientes de BRCA1 (MDA-MB-436) y p53 (MDA-MB-231) comparadas con las células MCF-7. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con reportes previos donde se observó que las células MCF-7 muestran resistencia a muerte celular inducida por radiación ionizante debido a la inactivación de la caspasa 3.

Los resultados con el siRNA específico para PARP-1 demostraron que la depleción de PARP-1 disminuye ligeramente la viabilidad celular, esto podría ser debido a que la nicotinamida ejerce diversas funciones biológicas incluyendo la inhibición de SIRT1 (del inglés silent mating type information regulation 2, homolog 1) una desacetilasa de histonas dependiente de NAD⁺ que regula la sobrevivencia celular y la respuesta a estrés. Diversos estudios han demostrado que la inhibición de SIRT1 por nicotinamida disminuye la viabilidad celular e induce apoptosis en células MCF-7, así como la inhibición del crecimiento celular y quimiosensibilización a gemcitabina en células de cáncer de páncreas^{42, 43}.

Nuestros resultados concuerdan con los reportes anteriores y sugieren que la nicotinamida podría considerarse como un fármaco de reposicionamiento para el tratamiento del cáncer. Uno de los principales inconvenientes para el tratamiento con nicotinamida es que el efecto antitumoral requiere concentraciones milimolares (>10 mM) cuando es usado como monoterapia. Sin embargo, cuando se utiliza como radiosensibilizador o en combinación con cisplatino, las concentraciones son mucho más bajas. Estudios de farmacocinética en pacientes

con cáncer reciben 6 g de nicotinamida al día vía oral, y han reportado una concentración plasmática de $>200 \mu\text{m}$ e interesantemente, no ha demostrado ninguna toxicidad.

Conclusiones

La nicotinamida podría ser utilizado como un quimiosensibilizador y radiosensibilizador en cáncer de mama teniendo como ventaja el amplio conocimiento de este fármaco en otros tipos de enfermedades y tomando en cuenta su baja toxicidad, por lo que podría ser un buen candidato para el reposicionamiento farmacéutico. Por otro lado sería interesante analizar su efecto como inhibidor de PARP-1 en otros tipos de cáncer y su eficacia en terapia combinada con quimiorradiación.

Bibliografía

1. INEGI. (2008). Estadísticas a propósito del día internacional de la mujer. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
2. Weitzel JN, Clague J, Martir-Negron A, Ogaz R, Herzog J, Ricker C, Jungbluth C, Cina C, Duncan P, Unzeitig G, Saldivar JS, Beattie M, Feldman N, Sand S, Port D, Barragan DI, John EM, Neuhausen SL, Larson GP. Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the south western United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. *J ClinOncol*. 2013 Jan 10;31(2):210-6.
3. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragoso-Ontiveros V, Vidal-Millan S, Herrera LA, Cantú D, Bargallo-Rocha E, Mohar A, López-Camarillo C, Pérez-Plasencia C. Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoSOne*. 2012;7(5):e37432.
4. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 *Science* 1994;266:66-71.
5. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92. Erratum in: *Nature* 1996 Feb 22;379(6567):749.
6. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):814-9. Review.

7. Drew Y, Plummer R. The emerging potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22: 67-71.
8. Calabrese CR, Almassay R, Barton S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:56–67.
9. De Soto JA, Wang X, Tominaga Y, Wang RH, Cao L, Qiao W, Li C, Xu X, Skoumbourdis AP, Prindiville SA, Thomas CJ, Deng CX. The inhibition and treatment of breast cancer with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) inhibitors. *Int J Biol Sci* 2006; 2:179-85.
10. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; 434:913-7.
11. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434:917-21.
12. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:517-2.
13. Oei SL, Herzog H, Hirschkauffmann M, et al. Transcriptional regulation and autoregulation of the human gene for ADP-ribosyltransferase. *Mol Cell Biochem* 1994; 138:99–104.
14. Alderson T. New targets for cancer chemotherapy: poly(ADP-ribosylation) processing and polyisoprene metabolism. *Biol Rev* 1990; 65:623–641.

15. Donawho CK, Luo Y, Luo Y, Penning TD, Bauch JL, Bouska JJ, Bontcheva-Diaz VD, Cox BF, DeWeese TL, Dillehay LE, Ferguson DC, Ghoreishi-Haack NS, Grimm DR, Guan R, Han EK, Holley-Shanks RR, Hristov B, Idler KB, Jarvis K, Johnson EF, Kleinberg LR, Klinghofer V, Lasko LM, Liu X, Marsh KC, McGonigal TP, Meulbroek JA, Olson AM, Palma JP, Rodriguez LE, Shi Y, Stavropoulos JA, Tsurutani AC, Zhu GD, Rosenberg SH, Giranda VL, Frost DJ. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2728-37.
16. Drew Y, Plummer R. PARP inhibitors in cancer therapy: two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications. *Drug Resist Updat* 2009;12:153-6.
17. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010;10:293-301.
18. Haince JF, McDonald D, Rodriguez A, Déry U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* 2008;283:1197-208.
19. Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 1999; 285:747-50.
20. Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Peralta A, Valenzuela MT, Matínez-Romero R, Quiles-Pérez R, Menissier-de Murcia J, de Murcia G, Ruiz de Almodóvar M, Oliver FJ. Interaction between ATM and

PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC MolBiol* 2007; 8:29.

21. Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, Oscier DG, Pratt G, Dyer MJ, Smith G, Powell JE, Rudzki Z, Kearns P, Moss PA, Taylor AM, Stankovic T. The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM deficient lymphoid tumour cells in vitro and in vivo. *Blood* 2010; [Epub ahead of print]
22. Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, Poirier GG. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J BiolChem* 2007; 282:16441-53.
23. Curtin NJ. PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 2005; 7:1-20.
24. Purnell MR, Whish WJD. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* 1980; 185:775-777.
25. Bowman KJ, White A, Golding BT, Griffin RJ, Curtin NJ. Potentiation of anti-cancer agent cytotoxicity by the potent poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors NU1025 and NU1064. *Br J Cancer* 1998; 78:1269-77.
26. Delaney CA, Wang LZ, Kyle S, White AW, Calvert AH, Curtin NJ, Durkacz BW, Hostomsky Z, Newell DR. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2860-7.
27. Martin SA, Lord CJ, Ashworth A. DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 80-6.

28. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17079-84.
29. Cousineau I, Abaji C, Belmaaza A. BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005 Dec 15;65(24):11384-91.
30. Hattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem.* 2000 Aug 4;275(31):23899-903.
31. Scully R. Interactions between BRCA proteins and DNA structure. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):67-73.
32. Murphy CG, Moynahan ME. BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective. *Cancer J.* 2010 Jan-Feb;16(1):39-47.
33. Drew Y, Mulligan EA, Vong WT, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, Mukhopadhyay A, LosG, Hostomsky Z, Plummer ER, Edmondson RJ, Curtin NJ. Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Feb 16;103(4):334-46.

34. Zheng YD, Xu XQ, Peng F, Yu JZ, Wu H. The poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide suppresses cell growth and migration, enhancing suppressive effects of cisplatin in osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2011 May;25(5):1399-405. doi: 10.3892/or.2011.1212.
35. Gottipati P, Vischioni B, Schultz N, Solomons J, Bryant HE, Djureinovic T, Issaeva N, Sleeth K, Sharma RA, Helleday T. Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer Res.* 2010 Jul 1;70(13):5389-98.
36. Hernández P, Olivera P, Dueñas-Gonzalez A, Pérez-Pastenes MA, Zárate A, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Gemcitabine activity in cervical cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001 Dec;48(6):488-92.
37. Chen G, Zeller WJ. Reversal of acquired cisplatin resistance by nicotinamide in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993;33(2):157-62.
38. Pandya KG, Patel MR, Lau-Cam CA. Comparative study of the binding characteristics to and inhibitory potencies towards PARP and in vivo antidiabetogenic potencies of taurine, 3-aminobenzamide and nicotinamide. *J Biomed Sci.* 2010 Aug 24;17Suppl 1:S16.
39. Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, Weinberg N, Amir G, Sagi M, Zlotogora J, Heching N, Peretz T. The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 505–14.

40. Levy-Lahad E, Catane R, Eisenberg S, Kaufman B, Hornreich G, Lishinsky E, Shohat M, Weber BL, Beller U, Lahad A, Halle D. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 1059–67.
41. Surjana D, Halliday GM, Damian DL. Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *J Nucleic Acids.* 2010 Jul 25;2010. pii: 157591. doi:10.4061/2010/157591.
42. Wang T, Cui H, Ma N, Jiang Y. Nicotinamide-mediated inhibition of SIRT1 deacetylase is associated with the viability of cancer cells exposed to antitumor agents and apoptosis. *Oncol Lett.* 2013 Aug;6(2):600-604.
43. Jafary H, Ahmadian S, Soleimani M. Synergistic anticancer activity of valproate combined with nicotinamide enhances anti-proliferation response and apoptosis in MIAPaca2 cells. *Mol Biol Rep.* 2014 Jun;41(6):3801-12.
44. Jung-Hynes B, Ahmad N. Role of p53 in the anti-proliferative effects of Sir 1 inhibition in prostate cancer cells. *Cell Cycle.* 2009 May 15;8(10):1478-83.
45. Bernier J, Denekamp J, Rojas A, Trovò M, Horiot JC, Hamers H, Antognoni P, Dahl O, Richaud P, Kaanders J, van Glabbeke M, Piérart M. ARCON: accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide in non small cell lung cancer: a phase I/II study by the EORTC. *Radio ther Oncol.* 1999 Aug;52(2):149-56.
46. Bernier J, Denekamp J, Rojas A, Minatel E, Horiot J, Hamers H, Antognoni P, Dahl O, Richaud P, van Glabbeke M, Piérart M. ARCON: accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide in head and neck

- squamous cell carcinomas. The experience of the Co-operative group of radiotherapy of the European organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Radiother Oncol.* 2000 May;55(2):111-9.
47. Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *NatRev Cancer.* 2002 Mar;2(3):188-200. Review.
48. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 2009 Jul 9;361(2):123-34.
49. Audrito V, Vaisitti T, Rossi D, Gottardi D, D'Arena G, Laurenti L, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. Nicotinamide blocks proliferation and induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the p53/miR-34a/SIRT1 tumor suppressor network. *Cancer Res.* 2011 Jul 1;71(13):4473-83.
50. Gien LT, Mackay HJ. The Emerging Role of PARP Inhibitors in the Treatment of Epithelial Ovarian Cancer. *J Oncol.* 2010: 151750.
51. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740: 364-78.
52. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72: 248-54.
53. Jang ER, Lee JS. DNA damage response mediated through BRCA1. *Cancer Res Treat.* 2004 Aug;36(4):214-21.

54. Zaremba T, Curtin NJ. PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007 Sep;7(5):515-23. Review.
55. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2010 Apr;10(4):293-301.
56. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):440-6.
57. Hoskin PJ, Rojas AM, Bentzen SM, Saunders MI. Radiotherapy with concurrent carbogen and nicotinamide in bladder carcinoma. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 20;28(33):4912-8.
58. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315-9.

Nicotinamide sensitizes human breast cancer cells to the cytotoxic effects of radiation and cisplatin

G. DOMÍNGUEZ-GÓMEZ^{1,2}, J. DÍAZ-CHÁVEZ², A. CHÁVEZ-BLANCO², A. GONZALEZ-FIERRO², J.E. JIMÉNEZ-SALAZAR¹, P. DAMIÁN-MATSUMURA³, L.E. GÓMEZ-QUIROZ⁴ and A. DUEÑAS-GONZÁLEZ^{2,5}

¹Postgraduate Program on Experimental Biology, Autonomous Metropolitan University at Iztapalapa, Mexico;

²Unit of Biomedical Research in Cancer, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico/

National Cancer Institute, Mexico; ³Department of Reproductive Biology, Autonomous Metropolitan

University at Iztapalapa, Mexico; ⁴Department of Health Sciences, Autonomous Metropolitan

University at Iztapalapa, Mexico; ⁵Tumor Study Group A.C. Mexico

Received October 1, 2014; Accepted November 18, 2014

DOI: 10.3892/or.2014.3661

Abstract. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors enhance the effect of DNA alkylating agents on *BRCA1*- and *BRCA2*-deficient cell lines. The aim of this study was to analyze the effect of the PARP inhibitor nicotinamide (NAM) on breast cancer cells with different *BRCA1* expression or function, such as *BRCA1*-deficient MDA-MB-436 cells, low expression *BRCA1* MCF-7 cells, and the *BRCA1* wild-type MDA-MB-231 cells, to demonstrate its effects as a chemo- or radiosensitizing agent. PARP activity was analyzed in MDA-MB-436, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells subjected or not to NAM. Inhibition of PARP by NAM in the presence of DNA damage was examined by Alexa Fluor 488 immunofluorescence. Crystal violet assays were used to test growth inhibition and the chemo- and radiosensitization effects of NAM were investigated using clonogenic assays. Significant differences among data sets were determined using two-tailed ANOVA and Bonferroni tests. We demonstrated that NAM reduces PARP activity *in vitro*, and in cells subjected or not to DNA damage, it also reduces the viability of breast cancer cell lines and synergizes the cytotoxicity of cisplatin in MDA-MB-436 and MCF-7 cells. Downregulation of PARP1 with siRNA led to modest growth inhibition, which was further increased by cisplatin. Nicotinamide also induced radiosensitization in MDA-MB-436 and MDA-MB-231 cells. In conclusion, NAM may be used as a chemo- or radiosensitizing agent regardless of the *BRCA1* status in breast cancer.

Introduction

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme inhibitors are emerging as a valuable new drug class in the treatment of cancer. PARP-1 is the founding member of a family of 18 PARP members that have been identified thus far. PARP-1 functions as a key molecule in the repair of DNA single-strand breaks (SSBs) via the base excision DNA repair (BER) pathway (1). Inhibitors of PARP-1 have been shown to enhance the cytotoxic effects of ionizing radiation and DNA-damaging chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo* (2,3). Early preclinical and clinical trial data suggest that PARP inhibitors may be used as chemo/radiotherapy sensitizers and as single agents to selectively kill cancers defective in DNA repair, specifically cancers with germ-line mutations in breast cancer-associated *BRCA1* and *BRCA2* genes, a strategy known as 'synthetic lethality' (4-7). There are currently at least eight PARP inhibitors being developed (8), however, the development of new drugs is extremely costly and there is a gap between the resources invested in drug development and their translatability into longer survival for cancer patients.

Repurposing existing drugs is another strategy for drug development in which safety pharmacology studies have been already done, which reduces the time and cost of approving the compounds for clinical use (9,10). Nicotinamide (NAM; pyridine-3-carboxylic acid) is a water-soluble amide active form of vitamin B3 or niacin. NAM and niacin are precursors for the synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide NAD⁺ and the phosphorylated derivative NADH⁺ (11). This drug has been used for the treatment of pellagra, diabetes mellitus, acne and schizophrenia and has been shown to have low toxicity even at high doses (12). NAM was identified as the first inhibitor of PARP, while the majority of PARP inhibitors contain the NAM pharmacophore (13). Preclinical studies have shown that NAM may exert antitumor effects and reverse chemotherapy resistance in some models (14). In addition, this drug is currently used as a component of accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide (ARCON), a therapeutic strategy used in non-small cell lung cancer, head

Correspondence to: Dr A. Dueñas-González, San Fernando 1, Tlalpan 14080, Edificio la Herradura, México City, México
E-mail: alfonso_duenasg@yahoo.com

Key words: niconamide, breast cancer, BRCA1, poly(ADP-ribose) polymerase, cisplatin

and neck and bladder cancer (15-18). In the present study, the results showed that NAM increased the cytotoxic effects of cisplatin and radiation on breast cancer cells.

Materials and methods

Cell lines. The MDA-MB-436, MDA-MB-231 and MCF7 human breast cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). MDA-MB-436 cells harbor 5396+IG > A (spliced donor site of exon 20), a BRCA1 mutation. MCF-7 and MDA-MB-231 cells express wild-type BRCA1 while MDA-MB-231 cells are hemizygous for *BRCA1*, with loss of one allele and the remaining non-mutated allele containing two non-pathogenic single-nucleotide polymorphisms. The cell lines were cultured in DMEM/F-12 medium, 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (1.0 mg/ml) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

PARP activity assay. PARP activity *in vitro* was assayed using the Trevigen Universal Chemiluminescent PARP assay kit (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Recombinant PARP was incubated for 1 h with different NAM doses (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75 and 1 mM) in the presence of activated DNA. Chemiluminescent detection was performed as per the manufacturer's instructions. To assay endogenous PARP activity, cells were grown in a 25-cm² cell culture flask in medium alone or with NAM for 72 h. The cells were washed once with ice-cold PBS, lysed in 50 µl of PARP buffer containing 0.5 mol/l NaCl, 1% (v/v) NP-40, and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) on ice for 30 min with occasional vortexing. The lysates were clarified by centrifugation at 14,000 rpm, at 4°C for 10 min. The protein concentration of the extracts was determined using the Bradford protein dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and PARP activity was assayed using the Trevigen Universal Chemiluminescent PARP assay kit according to the manufacturer's instructions, with modifications. The lysate (30 µg/well) was added in duplicate to wells containing PARP buffer and PARP cocktail, followed by incubation at room temperature for 1 h with NAM at concentrations of 0.5, 0.75 and 1 mM. Activated DNA was added to the standards but was omitted from the extracts. The plate was washed three times with PBS and three times with PBS and 0.1% Triton X-100, followed by incubation with streptavidin horseradish peroxidase (1:1,000 dilution) in diluent buffer for 1 h. The plate was washed again three times with PBS alone and three times with PBS and 0.1% Triton X-100. Chemiluminescent detection was performed as per the manufacturer's instructions. The background reading was subtracted from the readings of the samples, and PARP activity was calculated using the standard curve obtained from readings of the standards.

Immunofluorescence. The MCF-7, MDA-MB-436 and MDA-MB-231 cells were grown in chamber slides (Sigma-Aldrich) at a 70% of confluence. Immunostaining for poly (ADP-ribose) (PAR) was performed on cells fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. The cells were fixed 1 h after treatment with NAM at concentrations of 0.5, 1, 5 and 10 mM and exposed to H₂O₂ (1 mmol/l, 10 min, 37°C). Controls

were treated with medium alone. The primary antibody used was anti-pADPR (H10, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Poly ADP-ribosylation immunostaining was developed following NAM treatment. The secondary antibody used was the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Nuclear counterstaining with DAPI was performed after removal of excess secondary antibody. Immunostaining was visualized with a Carl Zeiss confocal multiphotonic laser microscope 780 NLO (Hamburg, Germany).

Cell viability assay. Cell viability was assessed by crystal violet staining. Semi-confluent culture flasks were trypsinized and 2.5x10⁴ cells were seeded in 12-well plates. After 24 h, the cells were exposed to NAM (5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mM) and cisplatin (20, 40, 60 and 80 µM) at the indicated concentrations. After 72 h, the cells were rinsed with PBS, fixed in 2% formaldehyde for 5 min and stained with 1% crystal violet. Relative cell viability was obtained by scanning with an ELISA plate reader at 540 nm.

Data analysis of drug combination. Synergism or additivity was determined by calculating the combination index (CI) using the equation: $CI_x = (D1/Dx1) + (D2/Dx2) + a(D1)(D2)/(Dx1)(Dx2)$, where CI_x is the CI value for x% effect, Dx1 and Dx2 are the doses of agents 1 and 2 required to exert x% effect alone, and D1 and D2 are the doses of agents 1 and 2 that elicit the same x% effect in combination with the other agent, respectively. The factor indicates the type of interaction: a = 0 for mutually exclusive drugs (similar mechanisms of action), and a = 1 for mutually non-exclusive drugs (independent modes of action), with the equation being resolved for a = 1. A CI of 1 indicates additivity, a CI of <1 synergism and a CI of >1 antagonism.

siRNA transfection assay. Cells were seeded in 12-well plates Nunc (Thermo Scientific™ Nunclon, Waltham, MA, USA) at 15x10³ cells/well into 0.5 ml of Optimem (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). After 24 h, the cells were transfected with lipofectamine and PARP1 siRNA (cat no. 4390824; Ambrion, Minneapolis, MN, USA) or RNAiMAX containing siRNA Scramble (cat no. 4390844; Ambrion). Cisplatin was added for 24 h and the cells were cultured at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 72 h, the medium was aspirated and the cells were processed for western blotting and cell viability.

Radiation and drug treatment. Ionizing radiation (IR) of cells was performed at room temperature in culture medium, using a Theratron Phoenix (60Co) irradiator (Best Theratronics Ltd., Ottawa, Ontario, Canada) with an average energy of 1.25 MeV in a field of 20x20 cm², to a distance isocenter of 80 cm. Cell lines were irradiated at a range of 0.5-6 Gy in the presence of different concentrations of NAM (0.5-20 mM). Control cells were treated with medium only.

Clonogenic assay. Exponentially proliferating cells were plated into a 25-cm² cell culture flask and incubated for 48 h to allow cells to reach their optimum proliferation rate. NAM (0.5, 1, 5, 10 and 20 mM) was added to the dishes and incu-

bated for 72 h and the cells were irradiated. Control cells were not treated. Cells were collected and cultured in drug-free medium in 60 mm Petri dishes for up to 21 days, depending on the proliferation rate of the individual cell line. Colonies were fixed in methanol and acetic acid (3:1 v/v), stained with crystal violet and counted with a stereoscopic microscopy [Leica Microsystems, (Schweiz) AG, Heerbrugg, Switzerland]. Data are expressed as the percentage of colonies in NAM-treated cultures compared with control cultures. Lethal concentration 50 (LC_{50}) was calculated for each cell line in each independent experiment. Each assay was performed in triplicate for each concentration. Plating efficiencies and the surviving fractions were calculated.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean \pm SD values. For statistical analysis the ANOVA and Bonferroni post-tests were used to mediate GraphPad Prism 5. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Nicotinamide decreases PARP activity. To examine whether NAM can inhibit PARP activity *in vitro*, a cell-free PARP activity assay was performed. Recombinant PARP was incubated for 1 h at different concentrations of NAM (50, 100, 200, 500, 750, and 1,000 μ M). A significant dose-dependent decrease of PARP activity, starting at 500 μ M was observed (Fig. 1A). We also examined whether NAM similarly inhibits PARP cell activity in MDA-MB-436 breast cancer cells deficient in BRCA1. Whole-cell lysates were incubated in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide NAD^+ and a conjugated histone acceptor protein, and in the absence of activated DNA, allowing us to determine already activated PARP. A significant decrease in PARP activity was observed (Fig. 1B).

Nicotinamide reduces poly ADP-ribosylation in the presence of DNA damage. To confirm that NAM inhibits poly-ADP-ribosylation, we induced DNA damage with H_2O_2 (10 mmol/l for 10 min) leading to poly-ADP ribosylation in the three cell lines after treatment with 0.5, 0.75, 1, 5 and 10 mM of NAM. We performed a series of immunofluorescent stainings using anti-pADPR. Fig. 2 shows that poly-ADP ribosylation was detected in the nuclei of cells treated with H_2O_2 . Its effect was reduced as a consequence of NAM treatment in a dose-dependent manner.

Growth inhibition by nicotinamide and cisplatin. To determine whether PARP inhibition with NAM sensitizes cell to cisplatin-induced death, we treated MDA-MB-436, MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines with cisplatin (0-100 μ M) and NAM (5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mM) and determined the IC_{50} value. Fig. 3A-C shows the IC_{50} value for NAM in each cell line (20-30 mM). On the other hand, because it has been reported that deficient BRCA1 cells are more sensitive to agents that induce DNA damage, we analyzed the effect of cisplatin in three cell lines to obtain the IC_{20} value through a dose response curve. The results demonstrated that MDA-MB-436 cells (Fig. 3D-F), deficient of BRCA1 were more sensitive than MDA-MB-231 and MCF-7 cells.

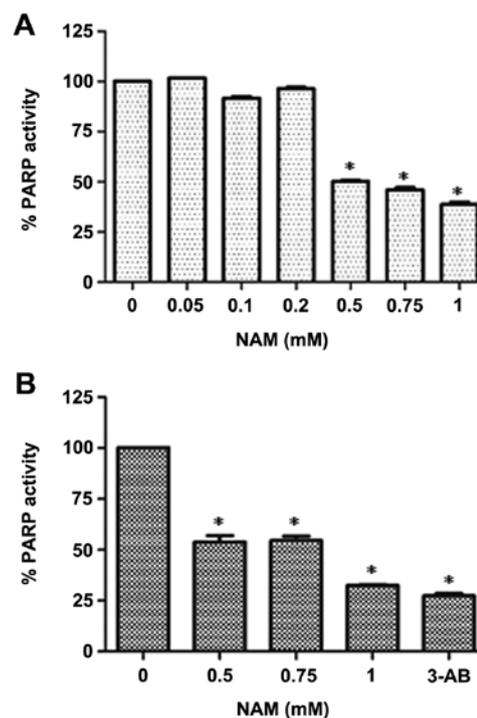


Figure 1. PARP inhibition by nicotinamide. (A) Nicotinamide inhibits *in vitro* PARP activity at concentrations starting at 0.5 mM. (B) Endogenous inhibition of PARP. At 1 mM inhibitory activity is similar to that achieved by the known PARP inhibitor 3-aminobenzamide. The average and SD from at least three experiments are shown. *Statistically significant compared with the control ($p < 0.001$).

Nicotinamide sensitizes breast cancer cells to cisplatin toxicity. We also analyzed the effect of co-treatment of NAM and cisplatin using a lower dose of cisplatin (IC_{20}) and varying doses of NAM (5, 10, 20 and 40 mM). The results demonstrated that a combination of NAM and cisplatin significantly decreased the viability of MDA-MB-436 and MCF-7 cells as compared to NAM alone ($P < 0.001$, Fig. 4A and C), while MDA-MB-231 cells showed no significant differences (Fig. 4B). On the other hand, when comparing the effect of NAM and cisplatin on the viability of breast cancer cells, we observed a significantly higher decrease compared to cisplatin alone ($P < 0.001$). To verify these results we determined the CI (combination index) using the median-effect method which revealed a clear synergistic interaction between NAM and cisplatin ($CI < 1$) in MDA-MB-436 and MCF-7 cells (Table I), whereas MDA-MB-231 cells failed to show a synergistic interaction.

Growth inhibition by PARP1 knockdown is increased by cisplatin. To determine to what extent the downregulation of PARP1 inhibited cell growth, MDA-MB-436 were subjected to siRNA against PARP1. The results showed that at 72 h there was complete knockdown of mRNA of PARP1 and cell growth was inhibited by 10%. When cisplatin was added this inhibition increased as compared to cisplatin alone or PARP1 inhibition. These differences were statistically significant. No growth effects were observed for scramble siRNA with or without cisplatin (Fig. 5).

Radiosensitivity in breast cancer cells by nicotinamide. The effect of NAM in combination with ionizing radiation (IR)

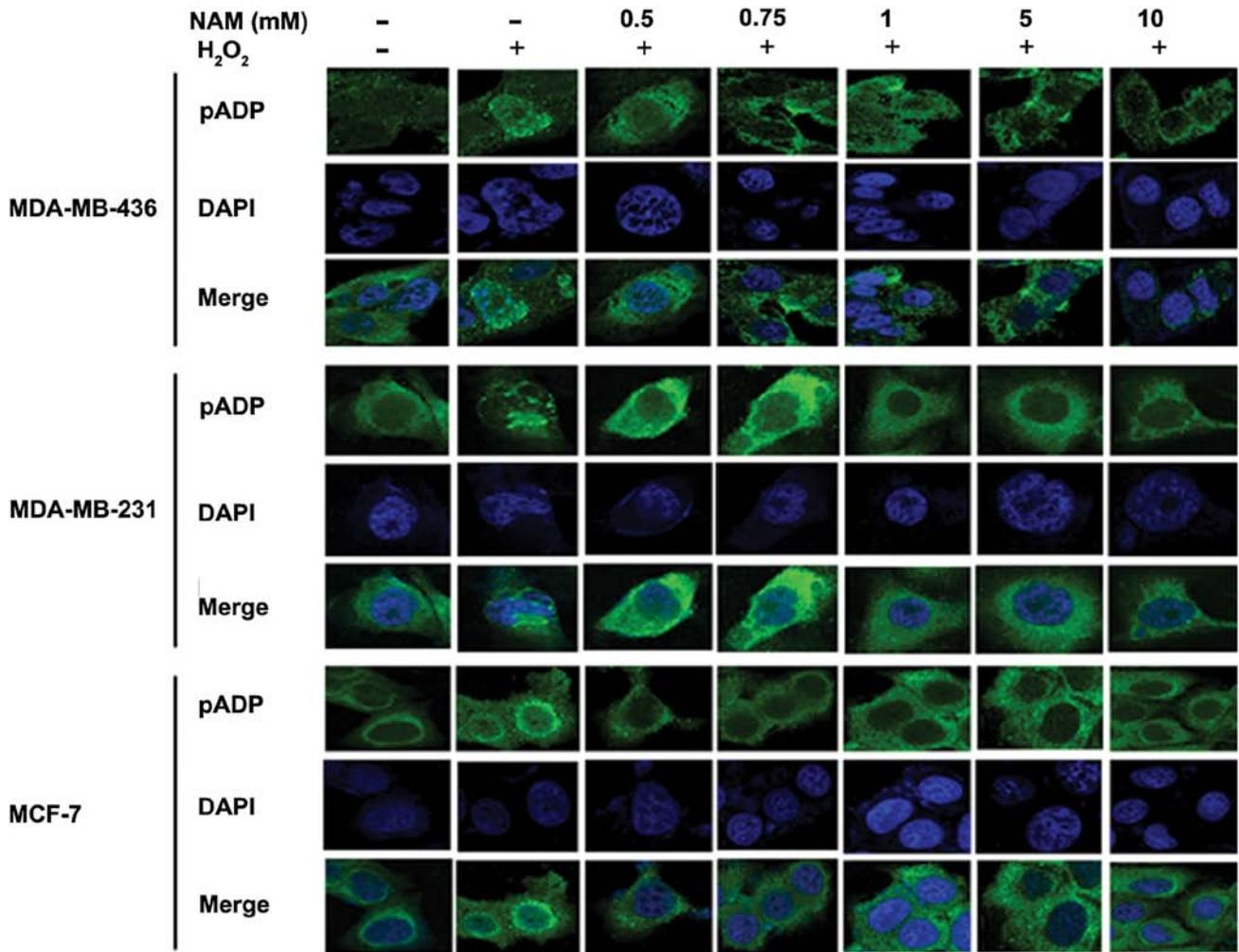


Figure 2. Endogenous PARP inhibition of ADP-ribosylation in cell nuclei. Nicotinamide inhibits the nuclear formation of polymers (ADP-ribosylation, pADP, green) in the presence of DNA damage induced by H₂O₂. Nuclei were counterstained with DAPI.

through clonogenic assay was analyzed to determine the colony-forming ability from a cell after inducing DNA damage. Survival curves were performed to determine the median lethal doses (LD50), which were defined as the absorbed dose of ionizing radiation (Gy) required to induce 50% cell death. The results demonstrated a different sensitivity to IR in cell lines. MDA-MB-436 cells were more sensitive to IR than MDA-MB-231 and MCF-7 cells (data not shown). Subsequently, we analyzed the effect of NAM combined with IR. A significant decrease in cell survival levels in MDA-MB-436 and MDA-MB-231 cells exposed to the combination compared with NAM only was observed ($P < 0.001$, Fig. 6A and B), while MCF-7 cells showed no significant differences ($P < 0.001$, Fig. 6C). When comparing the effect of the combination of NAM and IR versus IR only, we observed a significant effect on survival ($P < 0.001$, Fig. 6A and B), while MCF-7 cells showed no significant difference ($P < 0.001$, Fig. 6C).

Discussion

The results of this study show that NAM inhibits the growth of breast cancer cell lines in a dose-dependent manner. In addition, depletion of PARP1 mRNA reduces cell viability and

NAM increases the cytotoxic effects of cisplatin and induces radiosensitization to various degrees in MDA-MB-436, MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines.

A number of PARP inhibitors are being developed in the clinic as single agents and/or in combination with other drugs as potential enhancers of DNA-damaging cytotoxic agents, such as alkylating agents or radiation therapy. The chemistry of most of these agents is that of reversible NAD⁺ mimetics, although they have different bioavailability and molar equivalence for PARP enzyme inhibition (1,8). Nevertheless, cancer drug development needs alternative approaches for drug identification because of increasing failure rates, high cost, poor safety, limited efficacy, and a lengthy design and testing process of new entities. In this sense, drug repurposing of established non-cancer drugs that have anticancer activity provides an opportunity to rapidly advance therapeutic strategies in clinical trials (9,10).

Despite the long-established activity of NAM as a PARP1 inhibitor this drug has not been extensively evaluated as anti-cancer agent. However, it has largely been used in the clinic at pharmacological doses over many years with a low incidence of side effects and toxicity for diverse conditions including dermatological, metabolic and psychiatric disorders (19-22).

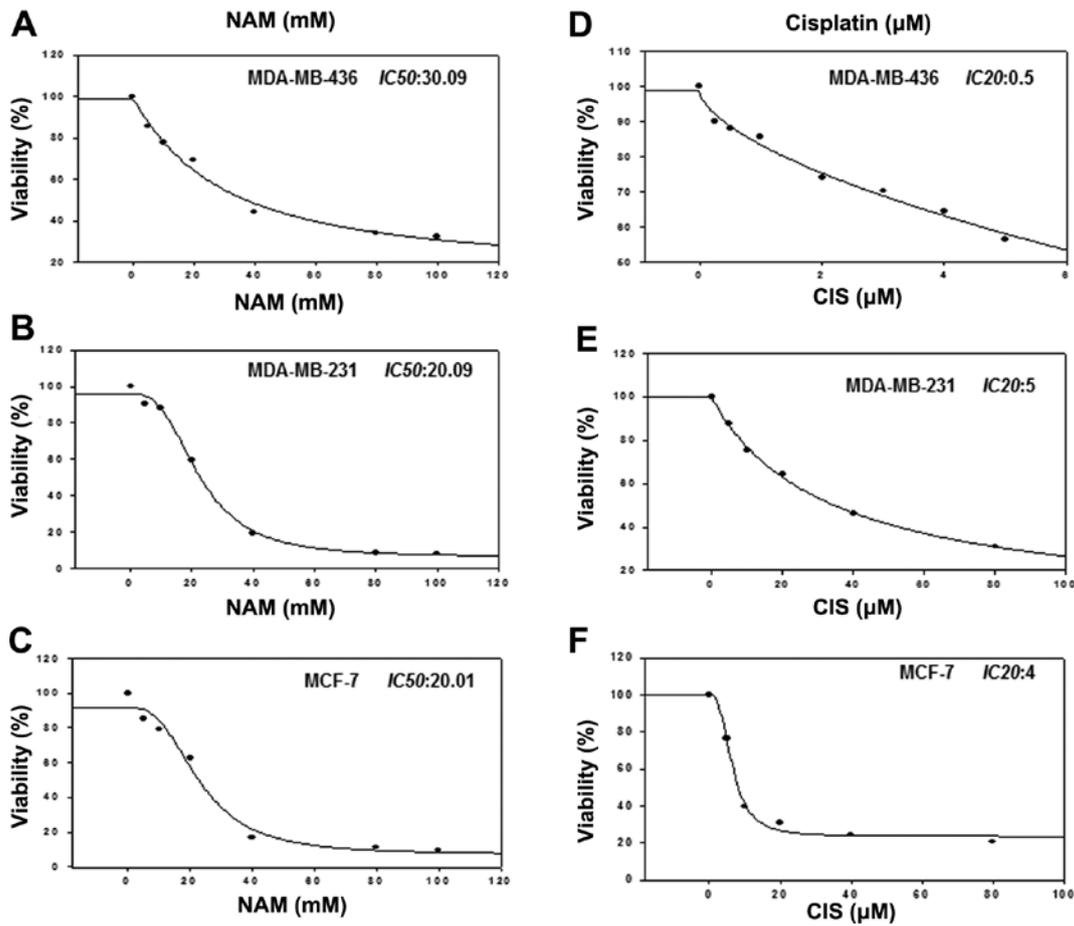


Figure 3. Growth inhibition by nicotinamide and cisplatin. MDA-MB-436, MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines were treated with cisplatin (0-100 μM) and NAM (5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 mM) to determine their IC₅₀ and IC₂₀ values, respectively. (A-C) IC₅₀ values for NAM were 30.09, 20.09 and 20.01 mM. (D-F) The corresponding IC₂₀ for cisplatin was 0.5, 5 and 4 μM.

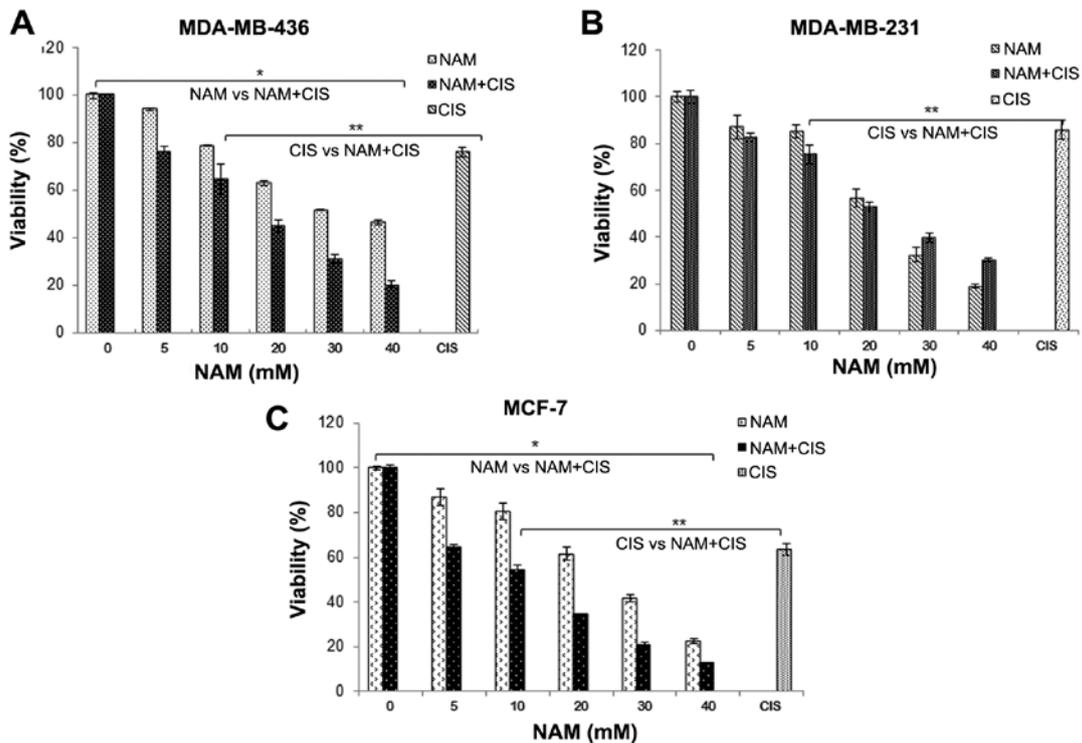


Figure 4. Chemosensitization by nicotinamide. Cells were treated with different doses of NAM for 72 h and cisplatin by 24 h. Average and SD from at least three experiments are shown. *Statistically significant with respect to NAM vs NAM+CIS (p<0.001). **Statistically significant with regard to CIS vs NAM (p<0.001).

Table I. Combination index of nicotinamide and cisplatin.

Cell line	Doses (mM)		Drugs alone		Control growth (x%)	Combination index (Cix) (ICx)	Interaction
	Nicotinamide (D1)	Cisplatin (D2)	Nicotinamide (Dx1)	Cisplatin (Dx2)			
MDA-MB-436	5	0.0005	11.1	0.0018	76	0.73	Synergistic
	10	0.0005	18.65	0.0041	64	0.66	Synergistic
	20	0.0005	39.14	0.11	45	0.52	Synergistic
	30	0.0005	121	0.12	31	0.25	Synergistic
	40	0.0005	122	0.13	19	0.33	Synergistic
MDA-MB-231	5	0.005	7.33	0.0082	82	1.29	
	10	0.005	10.03	0.0133	75	1.37	
	20	0.005	20.27	0.0345	52	1.13	
	30	0.005	28.35	0.0516	39	1.16	
	40	0.005	35.9	30.03	30	1.28	
MCF-7	5	0.004	14.34	0.0055	64	1.08	
	10	0.004	19.73	0.0082	54	0.99	
	20	0.004	34.28	0.0166	34	0.82	Synergistic
	30	0.004	51	0.15	20	0.62	Synergistic
	40	0.004	66	0.2	12	0.63	Synergistic

In cancer, NAM has been used in clinical studies in combination with accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide (ARCON) for radiosensitization (12,16-18). In the present study, we demonstrate that NAM effectively inhibits PARP activity *in vitro*, results that are consistent with those of previous reports (13). In addition, we show that NAM inhibits endogenous PARP activity in extracts from BRCA1-deficient MDA-MB-436 cells. PARP is important in DNA repair, and our results showed that NAM inhibits ADP-ribosylation in the presence of DNA damage induced by H₂O₂ in a dose-dependent manner in the three breast carcinoma cell lines examined, suggesting that NAM blocks DNA repair through PARP-1 inhibition. This effect is observed in the three breast cancer lines, indicating that its action is independent of the BRCA1 status. We analyzed whether inhibition of PARP induced by NAM or knockdown of PARP1 mRNA may have an effect on cell viability, demonstrating that both experimental conditions reduce cell viability.

It has been reported that PARP inhibition may potentiate the effects of antineoplastic DNA-damaging agents such as temozolomide, cyclophosphamide and platinum in BRCA1-deficient cells (23). Similarly, AZD2281, another PARP inhibitor, in combination with cisplatin synergistically induced cell growth inhibition of breast cancer cells deficient in BRCA2 (24). In agreement with findings of that report, our results demonstrate that the combination of NAM with cisplatin significantly decreased cell viability in the three breast cancer cell lines regardless of the BRCA1 status. Thus, NAM induces synthetic lethality in BRCA1-deficient breast cancer cells as is the case for other PARP inhibitors.

Inhibition of PARP activity reduced the single-strand breaks (SSBs) repair range and increased sensitivity to ionizing

radiation and antineoplastic agents. As such, PARP inhibition exerts radiosensitization by facilitating the conversion of an unrepaired SSB to double-strand breaks (DSBs) during the S phase of the cell cycle (25). Our results demonstrate a radiosensitizing effect of NAM (0.5 Gy) in cells deficient of BRCA1 (MDA-MB-436) and p53 (MDA-MB-231), compared to MCF-7 cells. In agreement with our results, it was previously reported that MCF-7 cells exhibit resistance to cell death induced by ionizing radiation caused by lack of caspase-3 activity (26).

The results of the siRNA demonstrate that depletion of PARP1 has only a modest effect on reducing cell viability. However, it is known that NAM exerts a number of biological actions including inhibition of SIRT1 (silent mating-type information regulation 2, homolog 1), which is a NAD⁺-dependent deacetylase that regulates the processes of stress response and cell survival (23). Studies have shown that SIRT1 inhibition by NAM decreases the viability of MCF-7 cells by inducing apoptosis through the activation of caspases (27) as well as growth inhibition and chemosensitization to gemcitabine in pancreatic cells (28).

Our findings and those of other studies on the antitumor effects of NAM in a number of cancer models suggest that this drug that can be clinically tested as a repositioned cancer drug. A major drawback for its potential application is that the antitumor effects of NAM require drug concentrations in millimolar ranges (>10 mM) when used as single agent. However, when used for radiosensitization or in combination with cytotoxic drugs, the effects are seen at lower molar concentrations. Pharmacokinetic studies in cancer patients receiving oral high-dose NAM show that at doses of 6 g daily, peak plasma concentrations can be as high as >200 µg/ml, which corre-

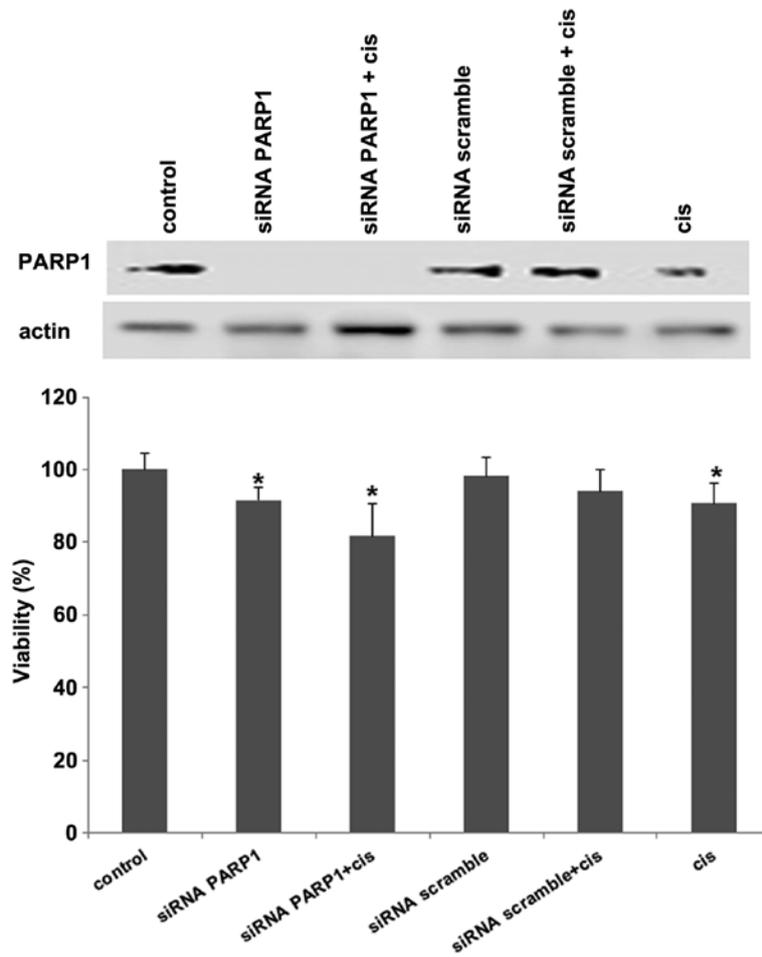


Figure 5. Growth inhibition by knockdown of PARP1 by siRNA. MDA-MB-436 cells were subjected to PARP1 knockdown by siRNA for 24 h and then treated with cisplatin for 24 h. PARP1 protein expression and cell viability were assessed 24 h later. Scramble siRNA was used as a negative control. *Statistically significant differences in cell growth inhibition as compared to the control ($p < 0.01$).

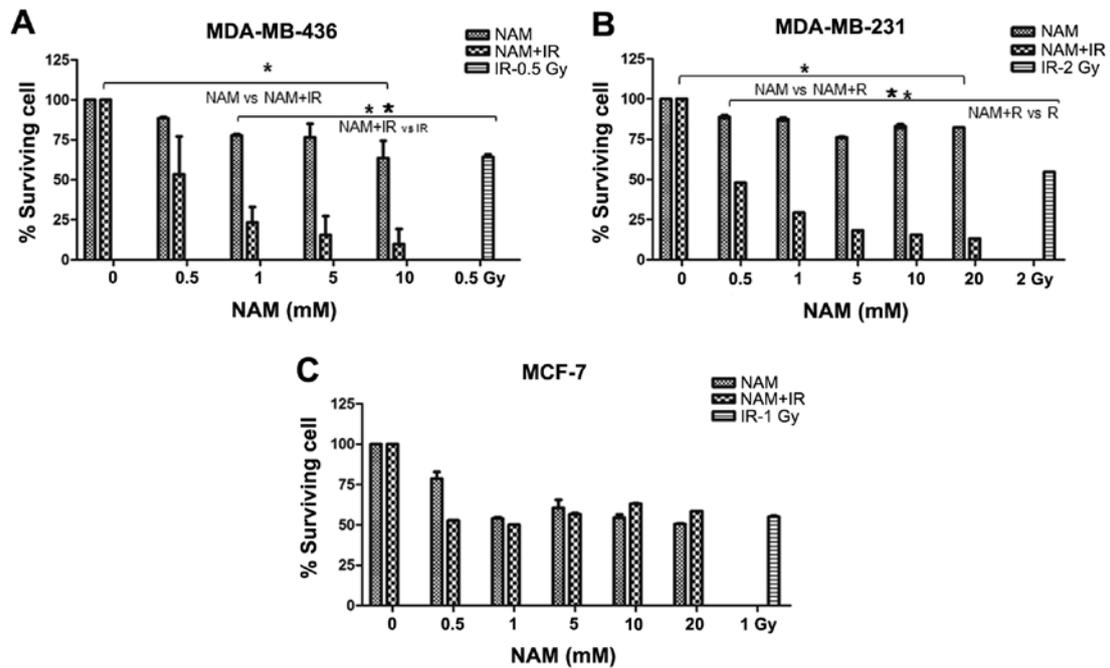


Figure 6. Radiosensitization by nicotinamide. (A) MDA-MB-436, (B) MDA-MB-231 and (C) MCF-7 cells were exposed to different concentrations of NAM for 72 h and IR. The IR dose varied depending on the cell line. Averages and SD from at least three experiments are shown. *Statistically significant as compared to NAM vs. NAM+IR ($p < 0.001$); **Statistically significant as compared to IR vs NAM+IR ($P < 0.001$).

sponds to molar concentrations >2 mM. No clinical significant toxicity other than easily controlled nausea and vomiting were observed (29-31). In summary, further investigation on NAM is required to evaluate its activity in other tumor models as well as to demonstrate whether it increases the efficacy of combined chemoradiation.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Patricia García López for valuable comments concerning this study as well as M.C. Roberto Lazzarini for technical assistance. This study was supported by CONACYT Mexico grant (203457).

References

- Davar D, Beumer JH, Hamieh L and Tawbi H: Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Curr Med Chem* 19: 3907-3921, 2012.
- Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K and Masutani M: Radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high linear energy transfer radiation. *Cancer Sci* 103: 1045-1050, 2012.
- Michels J, Vitale I, Senovilla L, *et al*: Synergistic interaction between cisplatin and PARP inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cell Cycle* 12: 877-883, 2013.
- De Soto JA, Wang X, Tominaga Y, *et al*: The inhibition and treatment of breast cancer with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) inhibitors. *Int J Biol Sci* 2: 179-185, 2006.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, *et al*: Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434: 913-917, 2005.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, *et al*: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434: 917-921, 2005.
- Murphy CG and Moynahan ME: BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective. *Cancer J* 16: 39-47, 2010.
- Hilton JF, Hadfield MJ, Tran MT and Shapiro GI: Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors as cancer therapy. *Front Biosci* 1: 1392-1406, 2013.
- Gupta SC, Sung B, Prasad S, Webb LJ and Aggarwal BB: Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol Sci* 34: 508-157, 2013.
- Dueñas-González A, García-López P, Herrera LA, Medina-Franco JL, González-Fierro A and Candelaria M: The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Mol Cancer* 7: 82, 2008.
- Surjana D, Halliday GM and Damian DL: Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *J Nucleic Acids* 2010 pii:157591, 2010.
- Knip M, Douek IF, Moore WP, *et al*: European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial Group Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 43: 1337-1345, 2000.
- Virag L and Szabo C: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54: 375-342, 2002.
- Chen G and Zeller WJ: Reversal of acquired cisplatin resistance by nicotinamide in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 3: 157-162, 1993.
- Kaanders JH, Bussink J and Van der Kogel AJ: ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy. *Lancet Oncol* 3: 728-737, 2002.
- Janssens GO, Rademakers SE, Terhaard CH, *et al*: Accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide for laryngeal cancer: results of a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 30: 1777-1783, 2012.
- Bernier J, Denekamp J, Rojas A, *et al*: ARCON: accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide in head and neck squamous cell carcinomas. The experience of the Co-operative group of radiotherapy of the European organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Radiother Oncol* 55: 111-119, 2000.
- Bernier J, Denekamp J, Rojas A, *et al*: ARCON: accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide in non-small cell lung cancer: a phase I/II study by the EORTC. *Radiother Oncol* 52: 149-56, 1999.
- Handfield-Jones S, Jones SK and Peachey RD: Nicotinamide treatment in diabetes. *Br J Dermatol* 116: 277, 1987.
- Niren NM: Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: a review. *Cutis* 77 (1 Suppl): 11-16, 2006.
- Kolb H and Burkart V: Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care* 22 (Suppl 2): B16-B20, 1999.
- Vallely JF, Lovegrove TD and Hobbs GE: Nicotinic acid and nicotinamide in the treatment of chronic schizophrenia. *Can Psychiatr Assoc J* 16: 433-435, 1971.
- Jung-Hynes B, Nihal, M, Zhong W and Ahmad N: Role of sirtuin histone deacetylase SIRT1 in prostate cancer. A target for prostate cancer management via its inhibition? *J Biol Chem* 284: 3823-3832, 2009.
- Audrito V, Vaisitti T, Rossi D, *et al*: Nicotinamide blocks proliferation and induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the p53/miR-34a/SIRT1 tumor suppressor network. *Cancer Res* 71: 4473-4483, 2011.
- Evers B, Drost R, Schut E, *et al*: Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res* 14: 3916-3925, 2008.
- Löser DA, Shibata A, Shibata AK, Woodbine LJ, Jeggo PA and Chalmers AJ: Sensitization to radiation and alkylating agents by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase is enhanced in cells deficient in DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther* 9: 1775-1787, 2010.
- Wang T, Cui H, Ma N and Jiang Y: Nicotinamide-mediated inhibition of SIRT1 deacetylase is associated with the viability of cancer cells exposed to antitumor agents and apoptosis. *Oncol Lett* 6: 600-604, 2013.
- Gong DJ, Zhang JM, Yu M, Zhuang B and Guo QQ: Inhibition of SIRT1 combined with gemcitabine therapy for pancreatic carcinoma. *Clin Interv Aging* 8: 889-897, 2013.
- Dragovic J, Kim SH, Brown SL and Kim JH: Nicotinamide pharmacokinetics in patients. *Radiother Oncol* 36: 225-228, 1995.
- Bernier J, Stratford MR, Denekamp J, *et al*: Pharmacokinetics of nicotinamide in cancer patients treated with accelerated radiotherapy: the experience of the Co-operative Group of Radiotherapy of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Radiother Oncol* 48, 123-133, 1998.
- Horsman MR, Hoyer M, Honess DJ, Dennis IF and Overgaard J: Nicotinamide pharmacokinetics in humans and mice: a comparative assessment and the implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 27: 131-139, 1993.