



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR B E INMUNOLOGÍA**

**Estudio del proceso de sensibilidad colateral en células
leucémicas murinas y humanas con fenotipo de
resistencia a múltiples fármacos (MDR)**

D. David Cerezo Fernández

2013

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales. Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 19 de junio de 2013".

INTRODUCCIÓN **1**

1. Importancia de la investigación en cáncer y en el fenotipo MDR.	1
2. Características del fenotipo MDR.	3
2.1. Bombas de extusión de fármacos. MDR-1.	4
3. Apoptosis en las células con fenotipo MDR.	7
3.1. Caspasas.	7
3.2. Familia Bcl-2.	8
3.3. Vías intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis.	9
4. Señalización intracelular en el fenotipo MDR.	10
5. Señalización extracelular en el fenotipo MDR.	12
6. Sensibilidad colateral en el fenotipo MDR.	13

OBJETIVOS **17**

MATERIAL Y MÉTODOS **19**

1. Células y cultivos celulares.	20
1.1. Células (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	20
1.2. Cultivos celulares.	20
1.3. Preparación de daunomicina (DNM).	21

2. Viabilidad y ciclo celular.	21
2.1. Determinación de viabilidad celular mediante citometría de flujo.	21
2.2. Técnica de MTT.	23
3. Inhibición de rutas de señalización intracelular y rutas de apoptosis.	24
3.1. Inhibición de rutas de MAPKs y ruta de PI3/Akt.	24
3.2. Inhibición de rutas de apoptosis dependientes de caspasas.	27
4. Detección de proteínas. Electro-inmunotransferencia (Western-blot).	28
4.1. Lisis celular con extractos celulares totales.	28
4.2. Cuantificación de proteína. Ensayo de Bradford.	29
4.3. Fraccionamiento de proteínas.	29
4.4. Transferencia y revelado.	30
4.5. Cuantificación y densitometría.	32
4.6. Anticuerpos utilizados.	33
5. Medida de la actividad caspasa 3.	34
6. Funcionalidad de Pg-p. Medida de la actividad extrusora de fármacos.	35
7. Silenciamiento de proteínas.	36
8. Determinación de citocinas.	38
9. Obtención de sublíneas celulares humanas resistentes a daunomicina. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	40

10. Análisis estadístico.	41
---------------------------	----

RESULTADOS **43**

1. Características de las sublíneas celulares murinas resistentes a fármacos.	45
1.1. Respuesta de células leucémicas murinas a estrés por daunomicina. Ensayo de MTT.	45
1.2. Expresión de glicoproteína P (P-gp, MDR-1, Abcb1).	47
2. Sensibilidad colateral al frío en células leucémicas murinas con fenotipo MDR.	48
3. Caracterización de la ruta de muerte celular inducida por exposición a bajas temperaturas en células con fenotipo MDR.	50
3.1. Determinación del tipo de muerte celular: apoptosis.	50
3.2. Implicación de las caspasas en la muerte celular inducida por estrés hipotérmico.	54
3.2.1. Determinación de la expresión de caspasa 3 activa mediante western-blot.	54
3.2.2. Ensayo colorimétrico para determinar actividad enzimática de caspasa 3.	55
3.2.3. Utilización de inhibidores farmacológicos específicos de caspasas.	56
4. Papel de glicoproteína P en la sensibilidad colateral al frío en células murinas con fenotipo MDR.	58
4.1. Expresión de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia.	58

4.2. Funcionalidad de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia. Acumulación de rhodamina 123.	60
4.3. Efecto del silenciamiento de Pg-p con oligonucleótidos de ARN sobre viabilidad celular y resistencia a múltiples fármacos.	63
4.3.1. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la supervivencia celular y los niveles de caspasa 3.	64
4.3.2. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la resistencia a fármacos.	66
5. Contribución de las proteínas de la familia Bcl-2 a la supervivencia de las líneas celulares leucémicas sensibles y resistentes a fármacos.	68
5.1. Niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en líneas celulares leucémicas de ratón sensibles y resistentes a fármacos.	68
5.2. Contribución de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 a la supervivencia celular en condiciones fisiológicas y de estrés.	69
5.3. Efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 sobre los niveles de caspasa 3 activa.	75
5.4. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre los niveles de proteínas de la familia Bcl-2.	76
6. Señalización intracelular. Contribución de la familia de MAPK a la muerte celular inducida por frío en células con fenotipo MDR.	78
6.1. Cinética de activación de proteínas MAPK en células leucémicas sensibles y resistentes a fármacos cultivadas a 4°C.	78
6.2. Efecto de los inhibidores de MAPK y PI3K/Akt sobre la	

sensibilidad colateral al frío de células leucémicas con fenotipo MDR.	82
6.2.1. Viabilidad en condiciones de estrés por frío.	83
6.2.2. Expresión de P-gp.	85
6.3. Redes de comunicación intracelular entre MAPK en condiciones de estrés por frío.	86
7. Producción de Citocinas. Papel de las citocinas en respuesta a estrés celular.	91
7.1. Determinación de citocinas intracelulares.	91
7.2. Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo.	93
8. Obtención de líneas leucémicas humanas resistentes a daunomicina. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	95
8.1. Características morfológicas.	96
8.2. Respuesta al estrés por tratamiento farmacológico.	96
8.3. Expresión y actividad de P-gp.	99
9. Sensibilidad colateral al frío en células leucémicas humanas con fenotipo MDR. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	101
10. Expresión de proteínas implicadas en supervivencia/muerte celular en las líneas celulares humanas, sensibles y resistentes a fármacos. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	103
10.1. Expresión de caspasas activas.	103
10.2. Expresión de proteínas de la familia Bcl-2	104

1. Modelo de resistencia a fármacos en células murinas y obtención de líneas celulares humanas con fenotipo MDR. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	108
2. Sensibilidad colateral a estrés hipotérmico en líneas celulares con fenotipo MDR. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	109
3. Moléculas implicadas en sensibilidad colateral por hipotermia en células con fenotipo MDR. Papel de P-gp. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	111
3.1. Participación de caspasas en la sensibilidad colateral frente a estrés hipotérmico. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	111
3.2. Participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la resistencia a daunomicina y en la sensibilidad colateral a estrés hipotérmico. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	114
3.2.1. Proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y Bcl-2. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	115
3.2.2. Proteína pro-apoptótica Bax. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	120
3.3.3. Proteína anti-apoptótica Mcl-1. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	121
4. Rutas de señalización intracelular involucradas en sensibilidad colateral al frío en células con fenotipo MDR.	122
5. Producción de citocinas en células con fenotipo MDR.	127

CONCLUSIONES

129

(parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)

BIBLIOGRAFÍA

131

D^ª Elena Martín-Orozco Santiago, Profesora Titular de Inmunología de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA: Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Estudio del proceso de sensibilidad colateral en células leucémicas murinas y humanas con fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR)”, que presenta el Licenciado en Biología por la Universidad de Murcia D. David Cerezo Fernández para optar al título de Doctor, contiene fielmente el trabajo experimental realizado bajo mi dirección en el laboratorio de Inmunología de la Universidad de Murcia.

Una vez examinado su contenido, estimo que la Memoria cumple con los criterios de rigor y calidad científica exigibles y autorizo su defensa ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, expido y firmo la presente certificación.

Murcia a 10 de junio de 2013.

Fdo. Elena Martín-Orozco Santiago.

A mi yaya

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Elena, por estar siempre ahí, por ser una buena guía y enseñarme todo sobre el fenotipo MDR, por trabajar codo con codo conmigo en el laboratorio, por no rendirte nunca y por todos los momentos buenos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de Bioquímica e Inmunología, Marta, Bruno (el sobri), Ana Lambertos (Mrs. Lambert), Conchi, Ana Belén, Miriam, Ruth, Chiara, María y Trini, por vuestra ayuda, vuestro interés en mi trabajo y por vuestra ayuda siempre que os he necesitado. A nuestros alumnos internos Alejandro y Azahara porque me habéis librado de rotular muchos tubos. A Ana Tapia (Mrs. Wall) por todos los momentos compartidos (buenos y malos) y por hacer que el proceso de realizar esta tesis sea mucho más agradable. A Antonio J. Ruiz (El Capo/ El Chache) por ser mi maestro del western y del MTT y un apoyo tan importante en el laboratorio además de un buen amigo. A Pilar García-Peñarrubia porque sin su apoyo no hubiera podido realizar este trabajo y por compartir su sabiduría.

A Manuel Cánovas, porque sin su apoyo no habríamos podido realizar gran parte de este trabajo, espero que esta colaboración siga por mucho tiempo y siga dando buenos frutos a pesar de los temporales que puedan venir.

A mis padres Angelita y Pepe, por ser el viento que impulsa mis alas desde el momento en que nací y por ser capaces entregarse en cuerpo y alma a sus hijos. A mi sobrino Lorenzo por iluminar los momentos oscuros y por aprender a decir mdr-1, caspasa, bcl-2, apoptosis y tesis con 2 años de edad. A mis hermanos Fran, Marian y Gloria, porque siempre he podido contar con su apoyo para todo lo que he necesitado (juntos podemos con todo) y a mis cuñados Cristian, Bernabé y Noemí. A Juanjo, porque eres la otra parte de la balanza que me equilibra y la parte que me faltaba para completarme como persona, gracias por aguantarme durante el proceso de esta tesis, tú eres quién más lo ha sufrido.

A mis abuelos Angelita y Paco, porque siempre estáis ahí cuidando de mí y recordándome todas las cosas buenas que me habéis enseñado. A mis tíos Gloria y Jose, porque siempre puedo contar con vosotros para lo que sea.

A mis compis de la Clínica Thorax Irene, Carmen, Bea, Cristina, Azahara y Ramón, por preocuparos tanto por mí y por mi trabajo en esta tesis.

A mis compañeros y amigos de carrera y de los cursos de doctorado, porque ya podéis decir “habemus doctorem”, en especial a Elenita Cantero, Aisha de Ayala, Ana Argudo, Lorena Almagro, Rosa M^a Cruz, Helena den Haan, Mar Ubero, María Barreda, Nati (gracias por ese anticuerpo), Vicente Seco, Juan Antonio Sarabia, Antonio V. García Lacunza, Andrés Paredes, Daniel Mateos y Ana Espallardo.

Y a mis amigas Virginia, Natalia y Raquel porque estando cerca o lejos sé que os hace mucha ilusión que haya terminado esta tesis.

Gracias a la ciencia por cambiar mi vida y gracias a los muros que he tenido que derribar y a los que he tenido que bordear a lo largo de mi vida porque me han hecho más fuerte.

“When they excavated a Scythian burial mound in the Russian region of Tuva, about 10 years ago, archaeologists literally struck gold. Crouched on the floor of a dark inner chamber were two skeletons, a man and a woman, surrounded by royal garb from 27 centuries ago: headdresses and capes adorned with gold horses, panthers and other sacred beasts. But for paleopathologists, the richest treasure was the abundance of tumors that had riddled almost every bone of the man’s body. The diagnosis: the oldest known case of metastasizing prostate cancer.”

George Johnson, New York Times, December 27, 2010.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
2. Importancia de la investigación en cáncer y en el fenotipo MDR.	1
2. Características del fenotipo MDR.	3
2.1. Bombas de extusión de fármacos. MDR-1.	4
3. Apoptosis en las células con fenotipo MDR.	7
3.1. Caspasas.	7
3.2. Familia Bcl-2.	8
3.3. Vías intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis.	9
4. Señalización intracelular en el fenotipo MDR.	10
5. Señalización extracelular en el fenotipo MDR.	12
6. Sensibilidad colateral en el fenotipo MDR.	13
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	19
1. Células y cultivos celulares.	20
1.4. Células (parcilamente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	20
1.5. Cultivos celulares.	20
1.6. Preparación de daunomicina (DNM).	21

2. Viabilidad y ciclo celular.	21
2.1. Determinación de viabilidad celular mediante citometría de flujo.	21
2.2. Técnica de MTT.	23
3. Inhibición de rutas de señalización intracelular y rutas de apoptosis.	24
3.1. Inhibición de rutas de MAPKs y ruta de PI3/Akt.	24
3.2. Inhibición de rutas de apoptosis dependientes de caspasas.	27
4. Detección de proteínas. Electro-inmunotransferencia (Western-blot).	28
4.1. Lisis celular con extractos celulares totales.	28
4.2. Cuantificación de proteína. Ensayo de Bradford.	29
4.3. Fraccionamiento de proteínas.	29
4.4. Transferencia y revelado.	30
4.5. Cuantificación y densitometría.	32
4.6. Anticuerpos utilizados.	33
5. Medida de la actividad caspasa 3.	34
6. Funcionalidad de Pg-p. Medida de la actividad extrusora de fármacos.	35
7. Silenciamiento de proteínas.	36
8. Determinación de citocinas.	38

9. Obtención de sublíneas celulares humanas resistentes a daunomicina.(afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	40
10. Análisis estadístico.	41

RESULTADOS

43

1. Características de las sublíneas celulares murinas resistentes a fármacos.	45
1.1. Respuesta de células leucémicas murinas a estrés por daunomicina. Ensayo de MTT.	45
1.2. Expresión de glicoproteína P (P-gp, MDR-1, Abcb1).	47
2. Sensibilidad colateral al frío en células leucémicas murinas con fenotipo MDR.	48
3. Caracterización de la ruta de muerte celular inducida por exposición a bajas temperaturas en células con fenotipo MDR.	50
3.1. Determinación del tipo de muerte celular: apoptosis.	50
3.2. Implicación de las caspasas en la muerte celular inducida por estrés hipotérmico.	54
3.2.1. Determinación de la expresión de caspasa 3 activa mediante western-blot.	54
3.2.2. Ensayo colorimétrico para determinar actividad enzimática de caspasa 3.	55
3.2.3. Utilización de inhibidores farmacológicos específicos de caspasas.	56
4. Papel de glicoproteína P en la sensibilidad colateral al frío en células murinas con fenotipo MDR.	58

4.1. Expresión de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia.	58
4.2. Funcionalidad de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia. Acumulación de rhodamina 123.	60
4.3. Efecto del silenciamiento de P-gp con oligonucleótidos de ARN sobre viabilidad celular y resistencia a múltiples fármacos.	63
4.3.1. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la supervivencia celular y los niveles de caspasa 3.	64
4.3.2. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la resistencia a fármacos.	66
5. Contribución de las proteínas de la familia Bcl-2 a la supervivencia de las líneas celulares leucémicas sensibles y resistentes a fármacos.	68
5.1. Niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en líneas celulares leucémicas de ratón sensibles y resistentes a fármacos.	68
5.2. Contribución de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 a la supervivencia celular en condiciones fisiológicas y de estrés.	69
5.3. Efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 sobre los niveles de caspasa 3 activa.	75
5.4. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre los niveles de proteínas de la familia Bcl-2.	76
6. Señalización intracelular. Contribución de la familia de MAPK a la muerte celular inducida por frío en células con fenotipo MDR.	78
6.1. Cinética de activación de proteínas MAPK en células	

leucémicas sensibles y resistentes a fármacos cultivadas a 4°C.	78
6.2. Efecto de los inhibidores de MAPK y PI3K/Akt sobre la sensibilidad colateral al frío de células leucémicas con fenotipo MDR.	82
6.2.1. Viabilidad en condiciones de estrés por frío.	83
6.2.2. Expresión de P-gp.	85
6.3. Redes de comunicación intracelular entre MAPK en condiciones de estrés por frío.	86
7. Producción de Citocinas. Papel de las citocinas en respuesta a estrés celular.	91
7.1. Determinación de citocinas intracelulares.	91
7.2. Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo.	93
8. Obtención de líneas leucémicas humanas resistentes a daunomicina. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	95
8.1. Características morfológicas.	96
8.2. Respuesta al estrés por tratamiento farmacológico.	96
8.3. Expresión y actividad de P-gp.	99
9. Sensibilidad colateral al frío en células leucémicas humanas con fenotipo MDR. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	101
10. Expresión de proteínas implicadas en supervivencia/muerte celular en las líneas celulares humanas, sensibles y resistentes a fármacos. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	103
10.1. Expresión de caspasas activas.	103

10.2. Expresión de proteínas de la familia Bcl-2	104
--	-----

DISCUSIÓN **107**

1. Modelo de resistencia a fármacos en células murinas y obtención de líneas celulares humanas con fenotipo MDR. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	108
2. Sensibilidad colateral a estrés hipotérmico en líneas celulares con fenotipo MDR. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	109
3. Moléculas implicadas en sensibilidad colateral por hipotermia en células con fenotipo MDR. Papel de P-gp. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	111
3.1. Participación de caspasas en la sensibilidad colateral frente a estrés hipotérmico. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	111
3.2. Participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la resistencia a daunomicina y en la sensibilidad colateral a estrés hipotérmico. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	114
3.2.1. Proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y Bcl-2. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	115
3.2.2. Proteína pro-apoptótica Bax. (parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	120
3.3.3. Proteína anti-apoptótica Mcl-1. (afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)	121
4. Rutas de señalización intracelular involucradas en sensibilidad colateral al frío en células con fenotipo MDR.	122
5. Producción de citocinas en células con fenotipo MDR.	127

CONCLUSIONES **129**

(parcialmente afectado por circunstancias de excepcionalidad por confidencialidad)

BIBLIOGRAFÍA **131**

INTRODUCCIÓN

- 1. Importancia de la investigación en cáncer y en el fenotipo MDR.**
- 2. Características del fenotipo MDR.**
 - 2.1. Bombas de extusión de fármacos. MDR-1.**
- 3. Apoptosis en las células con fenotipo MDR.**
 - 3.1. Caspasas.**
 - 3.2. Familia Bcl-2.**
- 4. Señalización intracelular en el fenotipo MDR.**
- 5. Señalización extracelular en el fenotipo MDR.**
- 6. Sensibilidad colateral en el fenotipo MDR.**

1. Importancia de la investigación en cáncer y en el fenotipo MDR.

No cabe duda de que el cáncer es una de las principales enfermedades que preocupan a la sociedad en la actualidad. Según datos del Ministerio de Sanidad (Informe nacional de salud 2010), durante el año 2007 murieron 151.426 personas por esta causa en España, representando la segunda causa de muerte en el país después de las enfermedades cardiocirculatorias. En el conjunto de la Unión Europea se da incluso una mayor tasa de mortalidad asociada al cáncer que en España, representando 172,7 muertes por cada 100.000 habitantes en el año 2007 en la Unión Europea y 157,1 muertes por cada 100.000 habitantes en España en el mismo año (Informe Eurostat 2010). A pesar de que la tasa de muertes debidas al cáncer ha disminuido en España y los demás países europeos desde el año 1990 (Cabanés A. et al. 2010), decreciendo un 8% entre los años 2000 y 2007 en el total de la Unión Europea y en España (Informe Eurostat 2010), sigue siendo imprescindible mejorar los tratamientos y la detección precoz, para lo que es necesario dedicar un gran esfuerzo de investigación tanto en los proyectos ya existentes como en los nuevos proyectos que aporten una nueva perspectiva.

Una de las mayores barreras en el tratamiento de tumores es la aparición de los fenotipos de resistencia a múltiples fármacos (fenotipo MDR, *multidrug resistance*). Esta resistencia al tratamiento se origina tras una exposición continuada a un fármaco concreto, confiriendo a las células MDR la capacidad de sobrevivir en presencia de un

amplio espectro de fármacos muchas veces no relacionados con el que ha originado la resistencia; esto es debido, principalmente, a la aparición de bombas de extrusión de fármacos en las células cancerosas MDR, que son capaces de expulsar del interior celular la mayoría de fármacos antineoplásicos. Entre las bombas de extrusión de fármacos, la más importante es MDR-1 (también llamada P-gp, Glicoproteína P o ABCB1), aunque también se pueden expresar otras como MRP (proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos), LRP (proteína de resistencia en pulmón), BCRP (proteína de resistencia en cáncer de mama), etc.

Se ha estudiado la aparición del fenotipo MDR frente a una gran variedad de fármacos antineoplásicos como doxorubicina, daunomicina, etopósido o vinblastina entre otros (Sikic BI et al., 1997; van der Kolk DM et al., 2003), observándose que las células tratadas con los mismos se hacían resistentes a otros tratamientos cuando expresaban una o varias de las bombas de extrusión de fármacos anteriormente citadas.

No hay estudios poblacionales que midan la frecuencia de aparición del fenotipo MDR, aunque sí hay estudios que describen la frecuencia de aparición de bombas de extrusión de fármacos en algunos tipos de cáncer; por ejemplo, en pacientes de mieloma múltiple que han sido tratados con vincristina y doxorubicina (VAD) la aparición de MDR-1 se da en el 45% de los casos, aumentando el porcentaje hasta el 100% de los casos conforme se aumenta la dosis (Grogan TM. et al. 1993); también se ha descrito que aumenta la frecuencia de aparición de MDR-1 en células de leucemia aguda mieloide según aumenta la edad del paciente (Willman C, 1997).

Las investigaciones sobre la aparición y características del fenotipo MDR en tumores se empezaron a realizar a finales del siglo XX y, desde entonces, se han multiplicado hasta nuestros días, poniendo de manifiesto la importancia de continuar la investigación en este campo. También hay un número considerable de empresas farmacéuticas que han desarrollado programas de investigación del fenotipo MDR desde la última década del siglo XX hasta ahora (Nature America Inc., 2000).

2. Características del fenotipo MDR.

La principal característica del fenotipo MDR en células cancerosas es la aparición de bombas de extrusión, que expulsan los fármacos del interior celular impidiendo que adquieran niveles citotóxicos para dicha célula. Además, son proteínas que utilizan ATP como fuente de energía, lo que provoca que la célula tenga que dedicar buena parte de su gasto energético a esta función en detrimento de otras; por ejemplo, una característica observada en células con fenotipo MDR es una disminución de la proliferación celular in vitro (Martín-Orozco E. et al., 2005). Además, la aparición del fenotipo MDR puede conllevar modificaciones en la expresión de proteínas que controlan una gran variedad de procesos celulares, entre las que se encuentran:

- Proteínas implicadas en procesos de apoptosis: Proteínas de la familia Bcl-2 (Ugurel S et al., 1992), IAPs (Proteínas inhibidoras de apoptosis) (Notarbartolo M et al., 2002).

- Proteínas implicadas en la señalización intracelular tales como las que participan en las rutas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la ruta de la fostadilinositol trifosfato quinasa (PI3K)/Serina-treonina quinasa (Akt) (Sui H et al., 2012).

- Proteínas implicadas en la señalización extracelular. (Frank MH et al., 2001; Pawlik A et al., 2005).

- Proteínas inducibles ante una respuesta de estrés, tales como HSP-27 (proteína de choque térmico 27) y HSP-70 (McCollum AK et al., 2008).

- Proteínas reguladoras de la replicación/repación de ADN, como topoisomerasa II (Lugmani YA, 2005).

- Moléculas de adhesión celular e implicadas en el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto, como las integrinas (Kenneth H et al., 2011).

Se han descrito tres formas de resistencia en células tumorales: intrínseca, constitutiva y transitoria (Scotto K.W. et al. 2001), tal como se muestra en la **figura 1.1**. La forma intrínseca hace referencia a una población de células que presenta propiedades de resistencia a fármacos de forma inherente, así el tumor está compuesto predominantemente por células con fenotipo MDR y la población permanece con las mismas características después del tratamiento. La forma constitutiva se refiere a una población celular constituida mayoritariamente por células sensibles a fármacos y una

pequeña parte de la población compuesta por células que han adquirido resistencia a quimioterapia. Mediante mutaciones desencadenadas como consecuencia del tratamiento antineoplásico, las células sensibles mueren y las resistentes sobreviven regenerando el tumor, constituido en su totalidad por células resistentes. La forma transitoria hace referencia a una población en la que la mayoría de células son sensibles a quimioterapia y una pequeña parte de la población es capaz de sobreexpresar el gen *MDR-1* convirtiéndose, transitoriamente (cuando se exponen al tratamiento), en células resistentes. Al final del tratamiento estas células son capaces de regenerar el tumor, compuesto ahora por células que sobreexpresarán la proteína MDR-1, cuando se sometan a tratamientos posteriores.

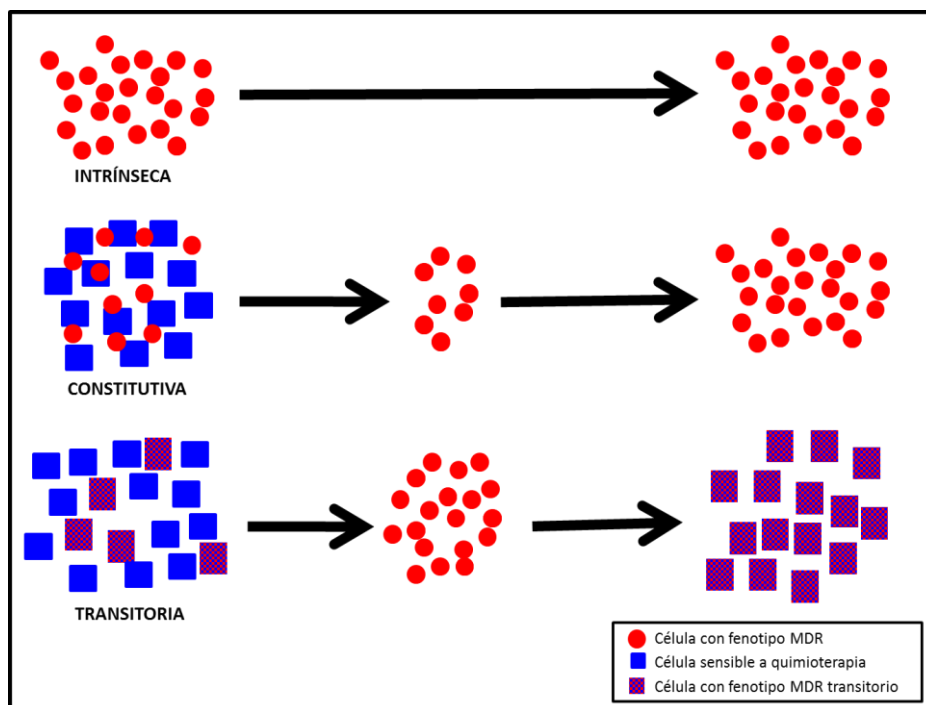


Figura 1.1. Formas de resistencia a quimioterapia en células tumorales. Descripción de las formas en que una población de células alcanza la resistencia a quimioterapia. Las células están indicadas mediante formas geométricas coloreadas y las flechas negras indican el tiempo durante el que se administra el tratamiento (Scotto K.W.et al. 2001).

2.1. Bombas de extrusión de fármacos. MDR-1.

Las principales bombas de extrusión de fármacos que pueden aparecer en células cancerosas con fenotipo MDR son MDR-1, la familia MRP (proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos), BCRP (proteína asociada a resistencia en cáncer de mama) y LRP (proteína asociada a resistencia en pulmón), siendo MDR-1 la principal

de ellas y la más estudiada. La proteína MDR-1, glicoproteína P o ATP Binding cassette B 1 (*Abcb1*), es una bomba de extrusión de fármacos que se expresa en la mayoría de las células cancerosas con fenotipo MDR y, de forma constitutiva, se expresa en células de la barrera hematoencefálica, en hígado, riñón y placenta (Scotto KW et al., 2001). La familia de proteínas MRP se expresa de forma ubicua en el organismo, BCRP se descubrió en células de cáncer mama con fenotipo MDR y LRP se descubrió en células de cáncer de pulmón también con fenotipo MDR.

MDR-1 es una glicoproteína transmembranal que tiene un peso molecular de 170kDa. En humanos, la isoforma de P-gp capaz de transportar fármacos está codificada por el gen *ABCB1* (*MDR-1*) mientras que en ratones hay dos isoformas codificadas por los genes *Abcb1a* y *Abcb1b* que comparten un 80 % de homología con la forma humana *ABCB1* y 92% homología entre sí. Aunque ambas isoformas son altamente similares, existen diferencias en su afinidad por distintos tipos de fármacos: por ejemplo, *Abcb1b* confiere alta resistencia in vitro a colchicina mientras que *Abcb1a* confiere baja resistencia a dicha molécula. Por el contrario, *Abcb1a* es más efectiva promoviendo resistencia a vinblastina que la isoforma *Abcb1b*. Respecto a su estructura, MDR-1 (Mason BL et al., 20012) consta de un extremo N-terminal de 10-15 kDa susceptible de glicosilación, la mitad N-terminal incluye 6 dominios transmembrana seguidos de un dominio citoplasmático de unión a ATP; la mitad carboxilo-terminal de la proteína también contiene 6 dominios transmembrana y un sitio citoplasmático de unión a ATP, esta mitad tiene un 65% de homología con la mitad N-terminal de la proteína (**figura 1.2**).

Se han descubierto distintos inhibidores farmacológicos de la proteína MDR-1, entre los que encuentran agentes bloqueantes de canales de calcio como verapamilo (VRP) y nicarpidina, medicamentos cardiovasculares (amiodarona, quinidina), medicamentos para la malaria (quinina, quinacrina), antibióticos (eritromicina, cefoperazona), ciclosporinas como la ciclosporina A, fenotiazinas como la flupenacina y hormonas (tamoxifeno, progesterona) (Covelli A et al., 1999). Algunos de estos inhibidores se han incluido en el tratamiento de cánceres con fenotipo MDR en combinación con la quimioterapia de uso protocolario. El hecho de que sea una proteína que se expresa en órganos encargados de la detoxificación fisiológica, siendo actor principal de este proceso, provoca que tenga que disminuirse la dosis de quimioterapia

en el paciente, puesto que, al inhibir también MDR-1 en las células detoxificantes, aumenta colateralmente la toxicidad del fármaco quimioterápico. Así, la utilización de

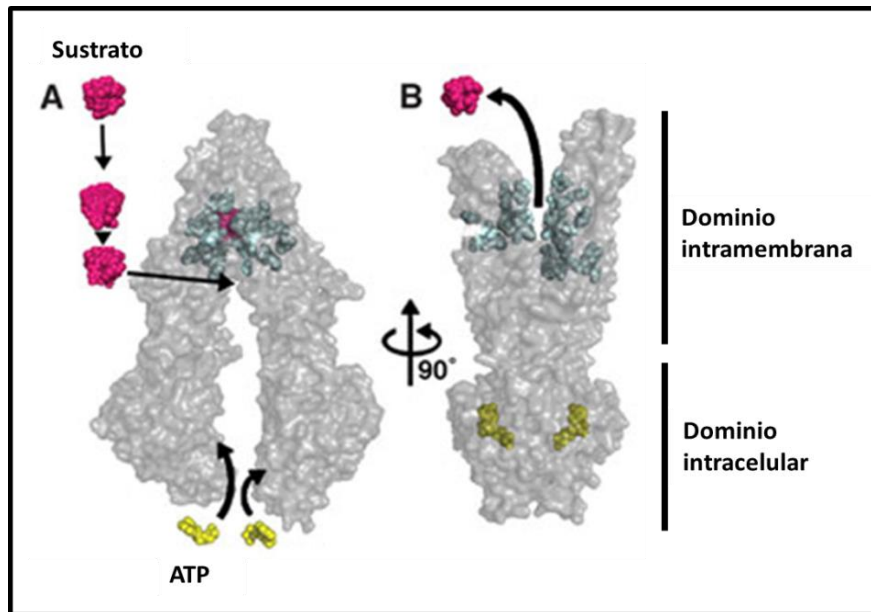


Figura 1.2. Esquema de la estructura de MDR-1/glicoproteína P. Esquema indicando las dos subunidades de P-gp con los dominios intramembrana e intracelular de ambas., el sitio de unión a ATP y el sitio de unión al sustrato (Aller SG et al., 2009).

estos inhibidores farmacológicos de MDR-1 lleva asociado un mayor control e impacto del tratamiento quimioterapéutico, por lo que se hace imprescindible la búsqueda de nuevos compuestos y de nuevas estrategias que puedan eliminar las células cancerosas con fenotipo MDR disminuyendo, al mismo tiempo, el impacto del tratamiento en el paciente; por ejemplo, buscando estrategias para actuar sobre MDR-1 sin afectar su funcionalidad extrusora.

Diversos estudios han descrito resultados que sugieren que la proteína P-gp muestra una actividad anti-apoptótica que, más allá de conferir resistencia a múltiples fármacos, también confiere resistencia a una gran variedad de estímulos apoptóticos dependientes de caspasas, incluyendo entre estos estímulos al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), ligando de Fas (FasL), privación de nutrientes y exposición a radiación ultravioleta (Johnstone R.W. et al. 1999).

3. Apoptosis en células con fenotipo MDR.

Tal como se ha descrito en el punto anterior, la glicoproteína P puede bloquear la apoptosis dependiente de caspasas, pero la implicación de esta proteína en el proceso de muerte celular va más allá de este hecho y en el fenotipo MDR también se pueden ver alteradas proteínas controladoras de apoptosis.

El proceso de apoptosis puede ocurrir por vías dependientes o independientes de caspasas y, dentro del primer tipo, existen dos vías generales, la vía intrínseca y la extrínseca. Además de las caspasas, en los procesos de apoptosis están implicadas otras proteínas importantes, entre las que se encuentran las proteínas de la familia Bcl-2, proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) y citocromo c.

3.1 Caspasas.

Las caspasas son un grupo de enzimas cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media en la ruptura de otras enzimas. Es una familia compuesta por 14 proteínas, de la que se han descrito 11 miembros en humanos. Las caspasas pueden tener una función reguladora de la inflamación o de la apoptosis, pudiendo clasificarse atendiendo a este criterio; así podemos considerar caspasa 1 como ejemplo de caspasa reguladora de la inflamación, puesto que es capaz de transformar la pro-interleucina 1 β en su forma activa interleucina 1 β , y podemos considerar las caspasas 3, 8, 9 y 7, como proteínas reguladoras de apoptosis.

Las caspasas reguladoras de apoptosis se clasifican en iniciadoras o efectoras según el lugar que ocupen en la cascada de señalización que regulan. Las caspasas iniciadoras (como caspasas 8 y 9) son las que actúan procesando las formas inactivas de las caspasas efectoras (como caspasa 3), que procesarán otros sustratos proteicos que mediarán en las distintas rutas de apoptosis.

La actividad de las enzimas caspasas reguladoras de apoptosis está controlada por varias proteínas de forma directa, entre las que destacan las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Las IAPs son poco conocidas, aunque los datos experimentales sugieren que pueden actuar directamente inhibiendo la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 y también puede actuar inhibiendo la actividad de caspasas iniciadoras como caspasa 9. Dentro de las IAPs se conocen 7 proteínas en humanos (Smolewski P.

et al. 2011), llamadas c-IAP (IAP celular), c-IAP-2, XIAP (IAP de unión al cromosoma X), BRUCE, livina, Ts-IAP (IAP específica de testículos), survivina, y NAIP (IAP neuronal).

3.2 Familia Bcl-2.

La familia de proteínas Bcl-2 (proteína de linfoma de células B 2) está constituida por una gran variedad de miembros que participan en la regulación (positiva y negativa) del proceso de apoptosis. Esta familia de proteínas se caracteriza por la presencia de cuatro regiones denominadas dominios de homología Bcl-2 (BH), que se nombran BH1-4 y se pueden clasificar en 3 subfamilias distintas atendiendo a los dominios que presenten:

- Subfamilia Bcl-2 (anti-apoptótica): Contiene los dominios BH1-4. Está constituida por las proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 y BCL-B.
- Subfamilia Bax (pro-apoptótica): Contiene los dominios BH1-3. Está constituida por las proteínas Bax, Bak y Bok.
- Subfamilia BH3 (pro-apoptótica): Contienen solo el dominio BH-3. Está constituida por las proteínas Bad, Bid, Bik, Blk, Bim, PUMA, NOXA, BMF y HRK.

Las proteínas anti-apoptóticas de la subfamilia Bcl-2 presentan todos los dominios de homología de la familia y ejercen su acción anti-apoptótica, principalmente, mediante la unión a las proteínas Bak/Bax impidiendo su función pro-apoptótica, también mantienen la integridad mitocondrial.

Las proteínas pro-apoptóticas de la subfamilia Bax se encuentran normalmente en la membrana mitocondrial, y actúan uniéndose entre ellas para formar un poro en la membrana que libera citocromo c, iniciando así una cascada de inducción de apoptosis.

Generalmente se considera el balance entre proteínas anti- y pro-apoptóticas como el principal mecanismo de regulación de apoptosis por parte de estas moléculas; así, si la cantidad de proteínas anti-apoptóticas es mayor, la célula sobrevivirá, en cambio, si la cantidad de proteínas pro-apoptóticas es mayor, la célula morirá.

Se han descrito diversos estudios sobre el papel de las proteínas anti-apoptóticas en la aparición de fenotipos MDR. Respecto a Bcl-2, se ha descrito en estudios de melanoma resistente a quimioterapia que las células con un ratio Bax/Bcl-2 bajo no son susceptibles de sufrir apoptosis por la vía de FasL (Ugurel S et al., 1992). También se ha descrito que Bcl-2 puede ser responsable de la neutralización de señales de apoptosis mediadas por el receptor TRAIL (Chawla-Sarkar M. et al., 2004). Además, se ha encontrado una relación entre la sobreexpresión de varios miembros de la familia Bcl-2 y la aparición de resistencia a quimioterapia en varios cánceres hematológicos (Buggins et al., 2010); al igual que se han observado grandes diferencias en el perfil de expresión de Bcl-2 en células cancerosas tras la adquisición del fenotipo MDR (Campane M et al., 2001; Simstein R et al., 2003). Por otro lado, Mcl-1 también se ha descrito recientemente como una proteína anti-apoptótica involucrada en el fenotipo MDR (Campbell KJ et al., 2010; Aliabadi HM, 2013).

3.3 Vías intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis.

Clásicamente se han considerados dos rutas principales de inducción de apoptosis: las vías extrínseca e intrínseca que se muestran en la **figura 1.3**. La vía extrínseca comienza con una señal extracelular desencadenada por la interacción de un ligando con su receptor de membrana correspondiente (como el Receptor de Fas o el de TNF [factor de necrosis tumoral]). Este receptor provoca la activación de caspasa 8 mediante fragmentación, y el fragmento activo de caspasa 8 es capaz de activar caspasa 3, actuando ésta última como caspasa efectora. La vía intrínseca o mitocondrial comienza con un daño o señal intracelular que es reconocido por la célula y se transmite una señal que cambia el balance de proteínas de la familia Bcl-2, provocando que dominen las proteínas pro-apoptóticas sobre las anti-apoptóticas, esto provoca que Bax y Bak puedan unirse para formar un poro en la membrana mitocondrial, liberándose una gran cantidad de citocromo c al citoplasma; citocromo c se une a la proteína Apaf-1 y a caspasa 9, formando un complejo llamado Apoptosoma que, mediante la activación de caspasa 9, es capaz de activar caspasa 3, y este es el punto en el que convergen las dos rutas de inducción de apoptosis. Además, caspasa 8 es capaz de activar la proteína Bid, inclinando la balanza de proteínas de la familia Bcl-2 hacia el lado de las proteínas pro-apoptóticas, induciendo así la vía intrínseca de apoptosis y aumentando la activación de caspasa 3 al estar actuando las dos rutas de inducción de apoptosis sobre dicha proteína.

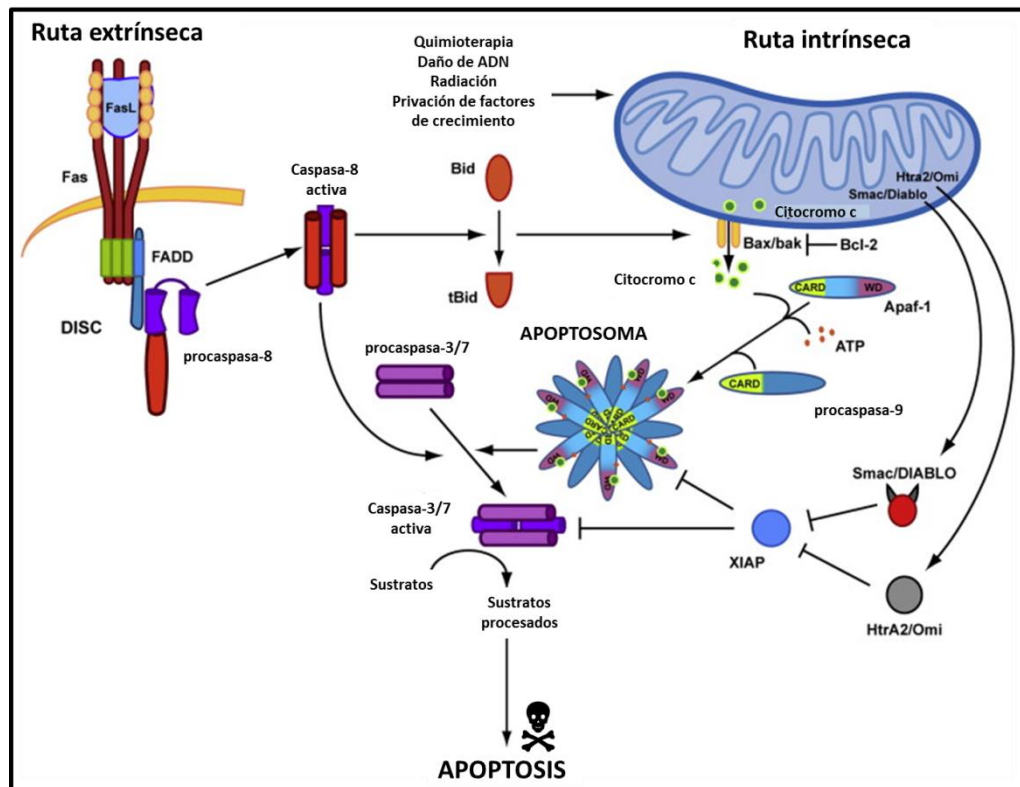


Figura 1.3. Esquema de las rutas intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis. Papel de algunas de las proteínas que participan en ambas rutas: familia Bcl-2, caspasas 8, 9, 3 y 7, proteína inhibidora de apoptosis XIAP y citocromo c, entre otras (Lamkanfi M et al., 2010).

4 Señalización intracelular y fenotipo MDR.

Las rutas de transducción de señales están controladas por la unión de moléculas señalizadoras a receptores de la membrana celular, causando la activación de proteínas citoplasmáticas que, en último lugar, activarán factores de transcripción. Se han descubierto varias rutas de señalización y factores de transcripción que influyen en la respuesta mediada por P-gp, incluyendo las rutas mediadas por Ras, la ruta de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/serina-treonina quinasa (Akt), proteína quinasa C (PKC), proteína p53, y otras (Sui H. et al. 2012).

La ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), o ruta mediada por Ras, transmite señales desde el exterior celular al interior a través de una cascada de fosforilación/desfosforilación (figura 1.4). El estímulo es reconocido por un receptor en la membrana y transmite la señal al interior celular a través de proteínas acopladas a la parte intracelular del propio receptor, estas molécula transmiten la señal a

través de una cascada de proteínas que acabará en una activación/desactivación de factores de transcripción y que determinará la respuesta de la células a través de la expresión/inhibición de genes específicos. Dentro de las proteínas MAPKs se reconocen, al menos, 3 familias de proteínas que controlan tres vías que se nombran según la proteína MAPK central de cada ruta:

- Ruta de ERK (Quinasa reguladora de señales extracelulares).
- Ruta de JNK/SAPK (Quinasa del extremo NH₂ terminal de c-jun/Proteína quinasa activada por estrés).
- Ruta de p38 (proteína de 38kDa).

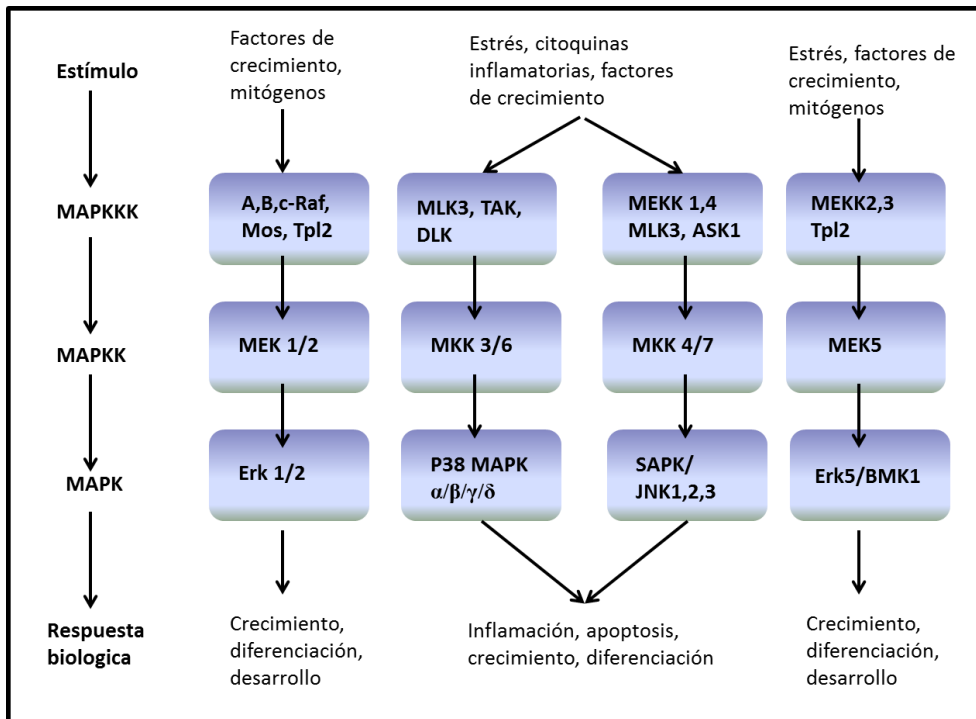


Figura 1.4. Esquema de ruta de MAPKs. En la parte de la izquierda se indica el funcionamiento general de las rutas de MAPKs, en la parte de la derecha detalle de las rutas de Erk1/2, p38, JNK y Erk5.

La ruta de PI3K/Akt también es una ruta de transmisión de señales extracelulares hacia el interior celular, estando implicada en señales de supervivencia celular/apoptosis, tal como se puede observar en la **figura 1.5**. Concretamente, la proteína Akt ejerce su función fosforilando la proteína Bad (de la familia Bcl-2) y caspasa 9, entre otras, inactivándolas y promoviendo de esta forma la supervivencia celular (Machín RP et al. 2006). Además, Akt activa el factor de transcripción NFκB, promoviendo la transcripción de genes codificantes de proteínas anti-apoptóticas;

adicionalmente actúa sobre el factor de transcripción CREB que activa la transcripción de proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 (Machín RP et al., 2006).

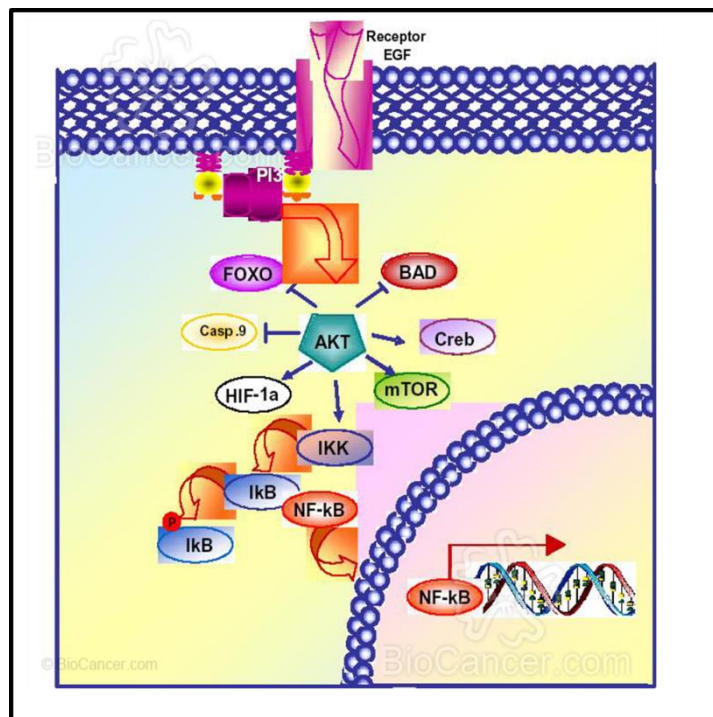


Figura 1.5. Esquema de ruta de PI3P/Akt. Esquema representativo de la ruta de señalización intracelular de PI3P/Akt donde se indican las principales interacciones de Akt sobre otras proteínas. El esquema utiliza como ejemplo la señal iniciada a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Machín RP et al., 2006).

Cambios en las rutas de señalización a través de proteínas MAPKs están estrechamente relacionados con la alteración de las rutas de inducción de apoptosis y con la expresión de la proteína P-gp. De acuerdo con esta afirmación, se ha observado que tanto JNK como ERK pueden regular la expresión de P-gp (Bark H. et al. 2010; Katayama K. et al. 2007). Por otro lado, se ha demostrado que, ante una señal de estrés, la activación de las proteínas JNK y p38 provoca la inhibición de ERK y la consecuente activación de la ruta intrínseca de inducción de apoptosis (Junttila MR et al., 2008).

5. Señalización extracelular en el fenotipo MDR.

Las citocinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen (células T, monocitos/macrófagos, células natural killers (NK), células B, eosinófilos, mastocitos, basófilos y otras células del organismo) y de las células

adyacentes. Son las encargadas de la comunicación extracelular y se producen principalmente en las células del sistema inmune. Atendiendo a su función, se pueden dividir según distintos criterios, entre los cuáles se encuentra su papel en los procesos inflamatorios, lo que permite clasificarlas en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Entre las citocinas antiinflamatorias se encuentran IL-2, IL-4, IL-10 y entre las pro-inflamatorias se encuentran IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e interferones (IFNs).

Se conoce muy poco acerca de cómo pueden influir las señales mediadas por citocinas en el fenotipo MDR, aunque sí se han identificado algunos de los procesos inflamatorios, citocinas y factores de crecimiento que pueden influir en la regulación de la expresión del gen *MDR-1* (Okamura N et al., 2004). Adicionalmente, se ha demostrado la importancia de las bombas de extrusión de fármacos en la respuesta inflamatoria puesto que estos canales de membrana pueden expulsar del interior celular mediadores lipídicos de la inflamación como son las prostaglandinas y leucotrienos y nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) (van de Ven R et al., 2009). Respecto a las citocinas, durante la última década, algunos estudios han postulado que las bombas extrusoras de fármacos, como P-gp, podrían funcionar como transportadores de citocinas como TNF- α , ILs (IL-2, IL-4, IL-12) e IFN- γ , y la inhibición de P-gp podría reducir la secreción de un gran número de estas proteínas (Drach J et al., 1996; Raghu G et al., 1996; Frank MH et al., 2001; Pawlik A et al., 2005), aunque es necesario realizar un mayor número de estudios para confirmar o desmentir esta posible función de P-gp.

6.Sensibilidad colateral en el fenotipo MDR.

El término sensibilidad colateral (CS) hace referencia a un proceso mediante el cual unas células, que han adquirido un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, se transforman en hipersensibles a otros tratamientos o estímulos (**figura 1.6**), pudiendo considerarse dicho proceso como “el talón de Aquiles” en el desarrollo del fenotipo MDR (Pluchino et al., 2012). Por tanto, una estrategia importante para el tratamiento de los tumores con fenotipo MDR, más allá de los agentes bloqueantes de bombas de extrusión de fármacos, es la identificación y utilización de agentes y/o estímulos capaces de eliminar las células con fenotipo MDR (sensibilidad colateral).

La primera observación de sensibilidad colateral en células eucariotas con fenotipo MDR se describió en 1976 (Bech-Hansen NT et al., 1976) en células de ovario de hámster chino (CHO). Desde entonces, cada vez son más los estudios que describen la existencia de fármacos capaces de eliminar células tumorales con fenotipo MDR, de manera que se está considerando la utilización de dichos fármacos en las nuevas estrategias quimioterapéuticas desarrolladas para eliminar tumores quimiorresistentes (Pluchino KM., et al., 2012).

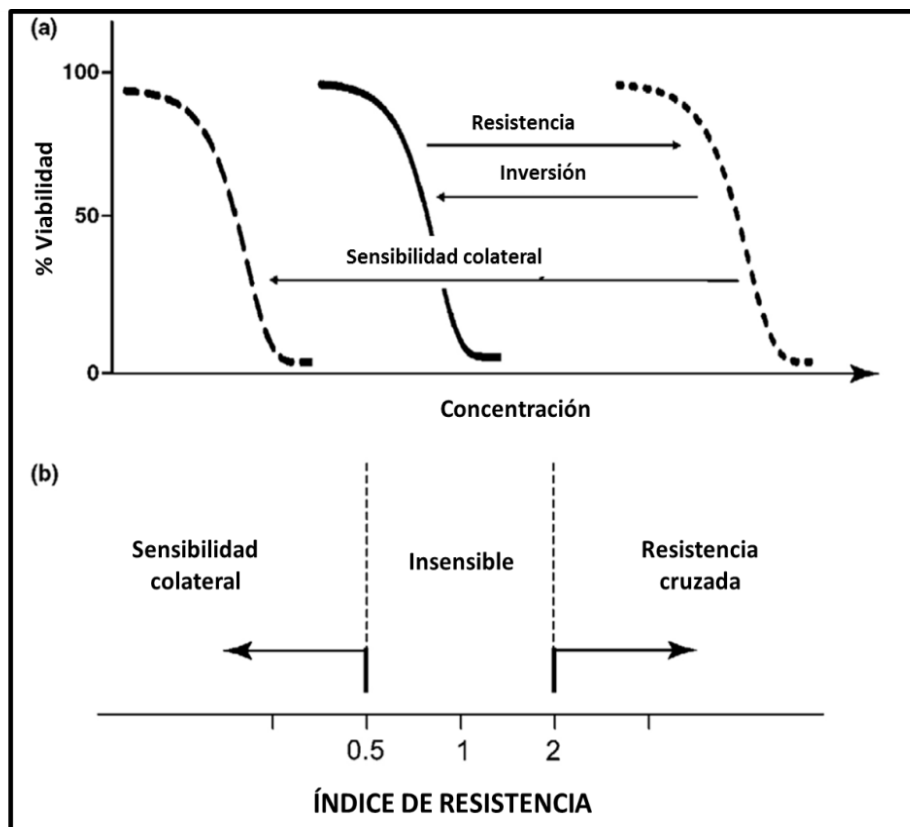


Figura 1.6. Representación esquemática del proceso de sensibilidad colateral. (a) Curva dosis-respuesta representativa de una línea celular parental (línea central sólida). Desarrollo de resistencia a fármacos conferida por la expresión de transportadores ABC como P-gp, que resulta en una pérdida de sensibilidad al tratamiento farmacológico (línea punteada de la derecha). Un pequeño número de agentes han demostrado ser capaces de eliminar las células MDR en un grado mayor que la línea parental de la que proceden (línea punteada de la izquierda), proceso denominado Sensibilidad colateral. (b) Determinación del grado de sensibilidad colateral y resistencia. (Hall MD et al., 2009).

En cuanto a los mecanismos responsables de dicho proceso, hasta el momento se han descrito, al menos, 4 hipótesis que podrían explicar el proceso de sensibilidad colateral en células con fenotipo MDR (Pluchino KM et al., 2012):

1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de una sobreutilización de las reservas energéticas de ATP.
2. Incremento de la sensibilidad a alteraciones del balance energético.
3. Extrusión de sustratos endógenos importantes para la supervivencia celular.
4. Alteración de la membrana citoplasmática.

La hipótesis más reciente se basa en la observación de que algunos agentes químicos inductores de sensibilidad colateral son sustratos de la bomba de extrusión de fármacos P-gp, estimulando su actividad ATPasa para ser expulsados de la célula. Este proceso se repite cíclicamente aumentando el gasto energético de P-gp (**figura 1.7**), lo cual conlleva a un aumento de la generación de radicales de oxígeno (ROS) y/o una pérdida de la protección frente al estrés oxidativo por la disminución de glutatión, alcanzándose unos niveles de producción de ROS capaces de desencadenar el proceso de apoptosis. (Hall MD et al., 2009; Laberge RM et al., 2009).

La segunda hipótesis hace referencia a agentes que alteran el balance energético de la célula, pero que no actúan aumentando la actividad ATPasa de las bombas de extrusión de fármacos. Estos agentes pueden perturbar rutas metabólicas como la de la glicolisis o la fosforilación oxidativa y afectar preferentemente a las células con fenotipo MDR (Bentley J et al., 1996).

La tercera hipótesis se basa en el hecho de que MRP1 es capaz de extruir moléculas o metabolitos esenciales para la célula, como glutatión (Deeley RG y Cole SP, 2006).

Por último, la cuarta hipótesis se refiere a agentes que son capaces de alterar la membrana celular, modificando su composición y su viscosidad, como los detergentes iónicos que pueden revertir, en cierto grado, el fenotipo MDR (Cano-Gauchi DF et al., 1991). Esta hipótesis se basa en la observación de que la expresión de P-gp puede alterar la composición de la membrana citoplasmática y el tráfico de vesículas hacia el interior celular (Ferte J, 2000).

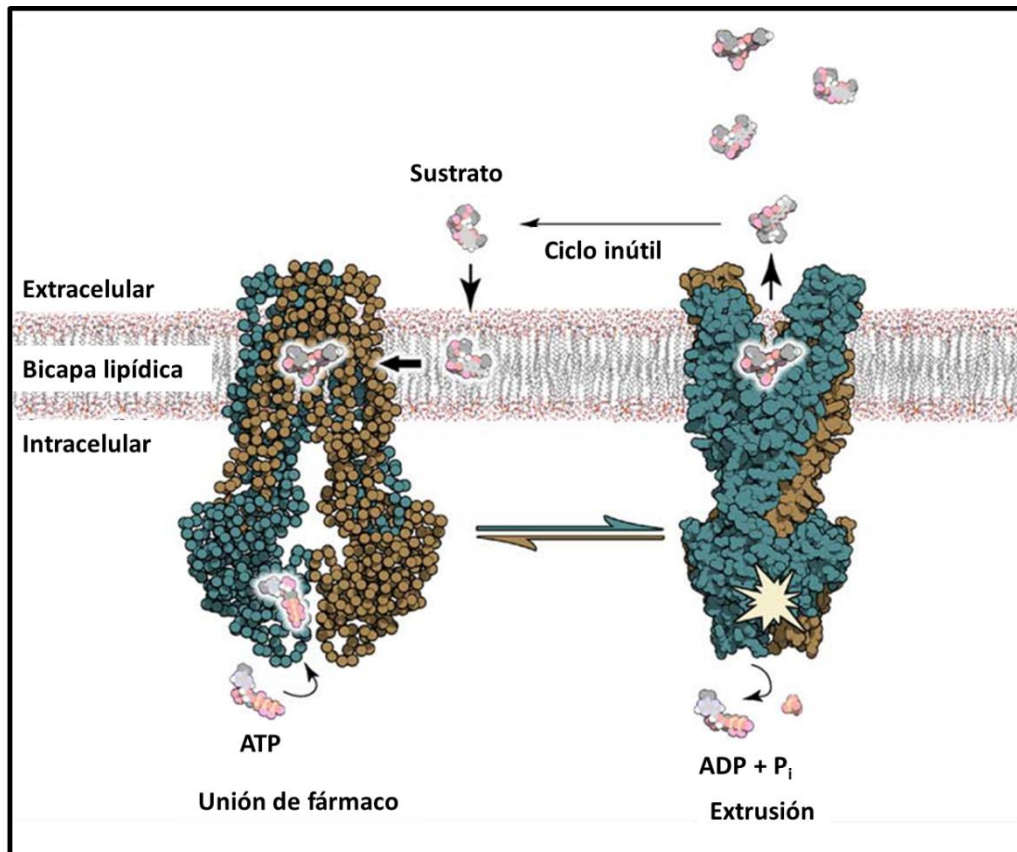


Figura 1.7. Esquema del ciclo inútil de P-gp provocado por inhibidores farmacológicos de esta proteína. Algunos inhibidores de P-gp provocan la sobreutilización de ATP induciendo un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y desencadenando un proceso de sensibilidad colateral. (Hall MD et al., 2009).

El proceso de sensibilidad colateral debe investigarse en mayor profundidad para poder confirmar estas hipótesis y explorar otras nuevas que permitan desarrollar terapias nuevas y más efectivas en el tratamiento de los tumores con resistencia a quimioterapia.

OBJETIVOS

Hipótesis: Puesto que existe una conexión entre dos de los mecanismos principales de adquisición de fenotipo MDR en células tumorales: expresión de P-gp y alteración de las rutas de inducción de apoptosis, es posible encontrar estímulos inductores de sensibilidad colateral en células quimiorresistentes, que permitan profundizar en la comunicación entre ambos mecanismos y que sirvan de base para nuevos tratamientos anti-neoplásicos complementarios a los ya existentes.

Objetivos

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Encontrar un estímulo capaz de inducir un proceso de sensibilidad colateral en un modelo de células leucémicas murinas con fenotipo MDR.
2. Determinar el mecanismo de muerte celular inducido por el proceso de sensibilidad colateral.
3. Analizar la contribución de diversas moléculas como P-gp y proteínas de la familia Bcl-2 al fenotipo MDR y al proceso de sensibilidad colateral.
4. Estudiar la influencia de la señalización intracelular a través de las rutas de MAPKs y PI3P/Akt en el proceso de sensibilidad colateral observado en células murinas con fenotipo MDR.
5. Determinar el perfil de citocinas que se produce en el modelo de células leucémicas murinas (parentales y con fenotipo MDR) en condiciones fisiológicas y en condiciones de estrés.
6. Obtener líneas leucémicas humanas con fenotipo MDR que nos permita disponer de un modelo celular humano similar a nuestro modelo murino.
7. Determinar si los resultados obtenidos en el modelo de células leucémicas murinas se puede extrapolar total o parcialmente al modelo de células leucémicas humanas con fenotipo MDR.

MATERIAL Y MÉTODOS

- 1. Células y cultivos celulares.**
 - 1.1. Células.**
 - 1.2. Cultivos celulares.**
 - 1.3. Preparación de daunomicina (DNM).**
- 2. Viabilidad y ciclo celular.**
 - 2.1. Determinación de viabilidad celular mediante citometría de flujo.**
 - 2.2. Técnica de MTT.**
- 3. Inhibición de rutas de señalización intracelular y rutas de apoptosis.**
 - 3.1 Inhibición de rutas de MAPKs y ruta de PI3/Akt.**
 - 3.2. Inhibición de rutas de apoptosis dependientes de caspasas.**
- 4. Detección de proteínas. Electro-inmunotransferencia (Western-blot).**
 - 4.1. Lisis celular con extractos celulares totales.**
 - 4.2. Cuantificación de proteína. Ensayo de Bradford.**
 - 4.3. Fraccionamiento de proteínas**
 - 4.4. Transferencia y revelado.**
 - 4.5. Cuantificación y densitometría.**
 - 4.6. Anticuerpos utilizados.**
- 5. Medida de la actividad caspasa 3.**
- 6. Funcionalidad de Pg-p. Medida de la actividad extrusora de fármacos.**
- 7. Silenciamiento de proteínas.**
- 8. Determinación de citocinas.**
- 9. Obtención de sublíneas celulares humanas resistentes a daunomicina.**
- 10. Análisis estadístico.**

1. Células y cultivos celulares.

1.1. Células.

Se utilizaron dos modelos celulares distintos: de ratón y humano. En primer lugar, se emplearon células de leucemia linfocítica murina de tipo pre-B denominada L1210 y su sublínea con resistencia a múltiples fármacos L1210R (Castro-Galache MD et al., 2003), además se utilizó una sublínea celular obtenida a partir de células de la línea parental L1210, transfectadas con un plásmido que contenía el gen *Mdr-1a*, codificante de la proteína P-gp murina (MDR-1, Abcb1a). Dicha sublínea se denomina CBMC-6 y fue proporcionada por los Drs. J.A. Ferragut y M. Saceda (Centro de Biología Molecular de Elche, Alicante).

En cuanto al modelo celular humano, se utilizó la línea celular IM-9 (ATCC [*American type cellular collection*, Estados Unidos], que es una línea linfoblástica de tipo B proveniente de un paciente con mieloma múltiple, transformada con el virus de Epstein-Barr EBV, CCL-159) (Brüning A et al., 2010). A partir de dicha línea parental, se desarrollaron sublíneas con fenotipos resistentes mediante exposición continuada a dosis crecientes del fármaco anti-neoplásico daunomicina (DNM). Las sublíneas resistentes desarrolladas fueron denominadas IM-9R_{0,5}, IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5} atendiendo a sus valores de IC₅₀ en presencia de daunomicina.

1.2. Cultivos celulares.

Los cultivos celulares se realizaron en frascos tratados para tal fin (Sarstedt, Alemania) de 25 o 100 ml, con medio de cultivo RPMI 1640 + GlutaMax (Gibco-Invitrogen, Estados Unidos) (el GlutaMax es una forma estable de glutamina) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% v/v (Gibco-Invitrogen, Estados Unidos) y una mezcla preparada de antibióticos Penicilina / Estreptomicina (P/S) al 1% v/v alcanzando una concentración final en el medio de cultivo de 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de Estreptomicina (Gibco-Invitrogen, Estados Unidos). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37°C con una atmósfera húmeda y un 5% de CO₂.

Para realizar la mayoría de los ensayos, las células se pusieron en cultivo a una concentración de 3×10^5 células/mL durante 24 horas antes de realizar los experimentos

y al inicio del mismo. Esto permitía que dichas células se encontraran en fase de crecimiento exponencial en el momento del ensayo y que los resultados obtenidos fueran reproducibles. Dependiendo del número de células necesario para el experimento, se utilizaron placas de 6 o de 24 pocillos estériles y tratadas para cultivo celular (Sarstedt, Alemania). Para realizar la técnica de nucleofección, se utilizaron los cultivos celulares a una concentración de 1×10^6 células/ml. Siempre que se lavaron las células se utilizó como tampón PBS 1X (Tampón fosfato salino) estéril (PAA, Estados Unidos), centrifugando a una fuerza de 270 g.

1.3. Preparación de daunomicina (DNM).

El fármaco DNM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) se preparó a partir de la disolución de 10 mg de dicho compuesto en agua desionizada filtrada a través de una membrana de $0,22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. A partir de esta disolución se prepararon varias diluciones en metanol a concentraciones menores a $10 \mu\text{M}$, para evitar la formación de agregados moleculares (Chaires JB et al., 1982). La concentración real de cada una de las disoluciones se calculó mediante medidas espectrofotométricas a una longitud de onda de 480 nm. Conociendo éstas y, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar para la DNM en metanol es de 11.500 M^{-1} , se determinó la concentración de la disolución inicial de DNM. A partir de esta disolución inicial se prepararon las distintas diluciones de trabajo que se guardaron a -20°C (Barcelo F et al., 1986).

2. Viabilidad y ciclo celular.

2.1. Determinación de viabilidad celular mediante citometría de flujo.

En cuanto a los estudios de viabilidad celular mediante citometría de flujo se utilizaron un citómetro FacSort y un citómetro FacScalibur (Beckton Dickinson, Estados Unidos). Se realizaron diferentes tinciones celulares, dependiendo del parámetro que se quisiera medir:

- Para medir la muerte celular, se realizó una tinción con yoduro de propidio (IP) ($50 \mu\text{g/ml}$), disuelto 1/20 en *Annexin V Binding Buffer* 1X (BD Pharmigen, Estados Unidos).

Unidos), con lo que se consiguió una concentración final de 2,5 µg/ml de yoduro de propidio.

- Para medir apoptosis temprana, se realizó una tinción con yoduro de propidio (2,5 µg/ml) y anexina V-FITC (anexina V conjugada con isocianato de fluoresceína) (1/20), diluïdos ambos en Annexin V Binding Buffer 1X (BD Pharmingen, Estados Unidos).
- Para diferenciar las fases del ciclo celular, las células se fijaron en una solución de etanol al 75%, se fijaron durante una hora a -20°C, se resuspendieron en 0,5 ml de tampón PBS suplementado con detergente Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 0,5% y ribonucleasa A al 0,05% (Serva Electrophoresis, Alemania). Posteriormente, las células se tiñeron con IP y se midió el contenido de ADN (ácido desoxirribonucleico) mediante citometría de flujo. Las células no viables (con un tamaño anormal) se excluyeron del análisis.

El IP es una molécula fluorescente con una masa de 668,4 Da que se usa para teñir las células debido a su capacidad para unirse al ADN, cuando se une a los ácidos nucleicos su fluorescencia de excitación máxima es de 535 nm y el máximo de emisión es de 617 nm. La membrana celular es impermeable para el IP y normalmente no difunde hacia el interior celular, excepto cuando la estabilidad de la membrana celular se ve comprometida por un proceso de muerte celular; en este caso, el IP penetra dentro de la célula y se une al ADN, una vez unido al ADN aumenta la intensidad de su fluorescencia 20-30 veces. Por estos motivos es una de las tinciones más utilizadas para identificar células en apoptosis o necrosis en una población celular (Cerezo D et al., 2012).

La anexina V es un miembro de la familia de proteínas intracelulares anexinas, que se unen a fosfatidilserina (PS). Dicha molécula (PS) se encuentra normalmente en la cara intracelular de la membrana en células sanas, pero durante la apoptosis temprana se pierde la asimetría de la membrana celular y PS se transloca hacia la membrana externa. La anexina V marcada con el fluorocromo FITC (que emite en una longitud de onda de 495-521 nm) se utiliza para identificar células en estadios de apoptosis temprana mediante citometría de flujo; además, en combinación con IP se utiliza para medir, en una población celular, la proporción de células que se encuentran vivas (negativo para

ambas tinciones), las células que están en apoptosis temprana (positivas para anexina y negativas para IP) y las células que están en apoptosis tardía o necrosis (positivas solo para IP).

También se realizaron fotografías de los cultivos celulares de las células murinas y humanas, tanto a 37°C como a 4°C. Estas fotografías se realizaron con microscopio invertido Nikon eclipse TE-200U (Japón) usando un objetivo de aumento 20X.

2.2. Técnica de MTT.

Para realizar ensayos de viabilidad frente al tratamiento con DNM también se utilizó el compuesto 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Alfa Aesar, Alemania). Estos son ensayos colorimétricos que se basan en la reducción del reactivo de MTT (soluble y de color amarillo) por enzimas metabólicas intracelulares, convirtiéndolo en su Formazán (insoluble y de color lila). Esta oxidación ocurre en la célula mediante enzimas oxidoreductasas dependientes de NAD(P)-H, permitiendo medir la actividad metabólica de las células (Berridge MV et al., 2005). Al ser un ensayo colorimétrico, se puede cuantificar la actividad reductora de los cultivos celulares midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 550nm, a la que se sitúa el máximo de absorbancia del formazán. Teniendo en cuenta que la actividad reductora de las células es indicador de su supervivencia, se puede considerar el resultado obtenido como indicativo y proporcional a la supervivencia celular, lo que ha convertido a este método en uno de los más utilizados para ensayos de citotoxicidad (Mosmann T, 1983).

El compuesto de MTT se diluyó en PBS 1X a una concentración de 2 mg/ml. Las células se incubaron en placas de 48 pocillos a una concentración de 3×10^5 células/mL en presencia de distintas concentraciones del fármaco DNM durante distintos tiempos. Transcurridos los mismos, se procedió a transferir alícuotas de 100 μ L (30.000 células) a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos. El efecto de cada dosis de DNM se estudió por triplicado. A cada pocillo se le añadió una cantidad de 20 μ L (0,04 mg de compuesto de MTT) de la solución de MTT (2 mg/ml) y se agitó, dejando incubar durante 2 horas a 37°C y en oscuridad. Al finalizar el periodo de incubación, se realizó la lisis celular añadiendo a cada pocillo 100 μ L de una solución de lisis celular (Isopropanol [Panreac, España], HCl 0,04 M [Merck, Alemania] y

detergente NP-40 0.1% [Sigma, Estados Unidos]). Finalmente, se midió la absorbancia a 550 nm con un sistema lector de placas Asys Jupiter (Austria).

La citotoxicidad se determinó comparando los valores de IC₅₀ obtenidos para cada línea celular, siendo estos valores los obtenidos al calcular la concentración del fármaco que provocaba la muerte del 50% de la población celular comparada con el control sin tratamiento farmacológico.

Para los ensayos de viabilidad celular post-silenciamiento de proteínas (ver apartado 7 de Material y métodos), se realizó también la técnica de MTT. Para estos ensayos, las células se sometieron al protocolo anteriormente expuesto 48 horas después de realizar el silenciamiento. Para cada silenciamiento se consideró el 100% de viabilidad celular como la absorbancia obtenida en los pocillos sin tratamiento farmacológico; así, esta técnica eliminó la distorsión producida por las diferencias en muerte celular que provocó cada silenciamiento.

3. Inhibición de rutas de señalización intracelular.

3.1 Inhibición de rutas de MAPKs y ruta de PI3/Akt.

Para inhibir estas rutas celulares se usaron los siguientes inhibidores:

Ruta intracelular	Nombre del inhibidor	Efecto inhidor	Conc.	Casa comercial	Nº catal.	Referencia Bibliográfica
Ruta de JNK	Inh JNK II SP600125	Homólogo a JNK1,2,3	50 µM	Callbio-chem	420119	Sui H et al., 2011.
Ruta de ERK	PD 98059	Inhibe MEK1/2	50 µM	Sigma-Aldrich	P215	Hung CC y Liou HH, 2011.
Ruta de p38	SB 203580	Impide la unión de ATP	50 µM	Sigma-Aldrich	S8307	Wartenberg M et al., 2005.
Ruta de Akt	LY 294002 hydrochloride	Inhibidor de PI3K	50 µM	Sigma-Aldrich	L9908	Ding S et al., 2001.

Tabla 3.1. Inhibidores de rutas de señalización intracelular.

Los inhibidores se prepararon a las concentraciones previamente descritas en diversos artículos (disolviéndolos en DMSO (dimetilsulfóxido)) y se añadieron al cultivo celular 1 hora antes de exponer las células al tratamiento con frío. Este era el tiempo necesario para que el inhibidor pudiera difundir hacia el interior celular y realizar su acción. En la **figura 3.1** se señala el punto de cada ruta de señalización de MAPKs en el que actúa cada inhibidor.

El inhibidor de la ruta de JNK (SP600125) actúa mediante inhibición competitiva con JNK por el sitio de unión de ATP, impidiendo así la fosforilación de los sustratos de JNK como la proteína c-Jun.

El inhibidor de la ruta de ERK (PD98059) actúa uniéndose a las formas inactivas de las proteínas MEK1/2, impidiendo su fosforilación por la proteína MEKK (Crews C.M. et al., 1992). Las proteínas MEK1/2 se encuentran aguas arriba de ERK en la ruta de señalización intracelular, por lo que este inhibidor provoca una inactivación de dichas proteínas al impedir su fosforilación.

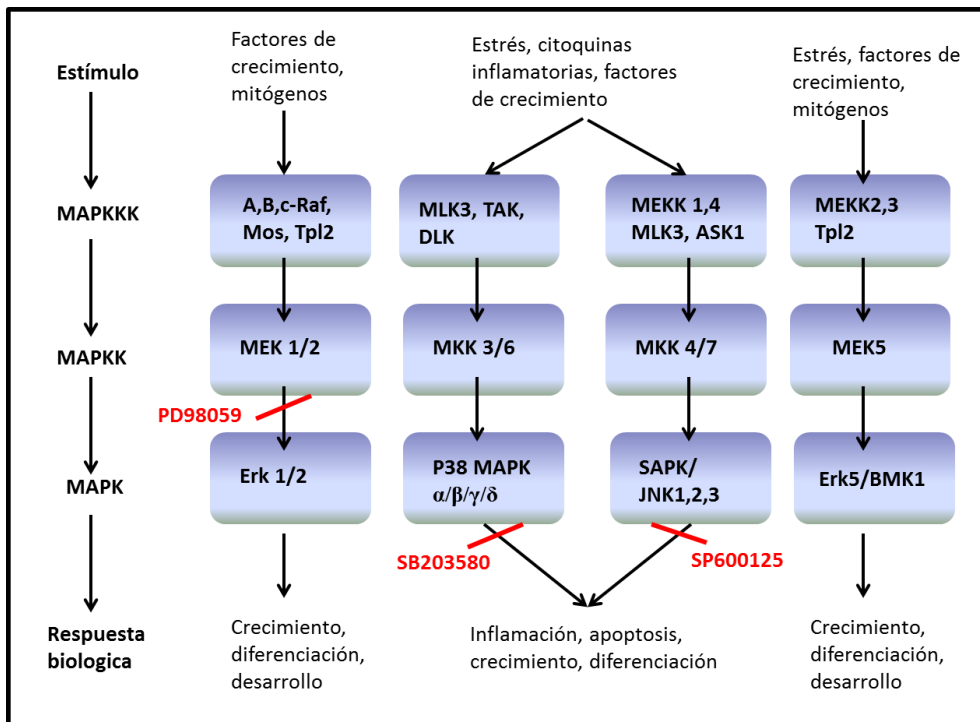


Figura 3.1. Esquema de la inhibición de las rutas de MAPKs. En la parte de la izquierda se indica el funcionamiento general de las rutas de MAPKs, en la parte de la derecha a detalle de las rutas de Erk1/2, p38, JNK y Erk5. En rojo aparecen los inhibidores utilizados y el punto donde actúan sobre la ruta de señalización que inhiben. PD 98059 que actúa sobre MEK1/2, SB203580 que actúa sobre p38 y SP600125 que actúa sobre JNK 1,2,3.

El inhibidor de la ruta de p38 (SB203580) es una molécula que actúa impidiendo la unión de ATP a su sitio de unión en p38, este hecho impide que pueda fosforilar a la proteína MAPKAPK-2 y por tanto, inhibe la ruta aguas abajo de p38 evitando la consecuente fosforilación de los sustratos de dicha MAPK, como la proteína HSP27 (Cuenda A. et al., 1995, Kumar S. et al., 1999).

El inhibidor de la ruta de PI3P/Akt (LY294002) actúa sobre la enzima PI3K que se encuentra aguas arriba de Akt en esta ruta (**figura 3.2**). Esta inhibición evita que se fosfore la proteína Akt, impidiendo así su activación (Vlahos C., 1994).

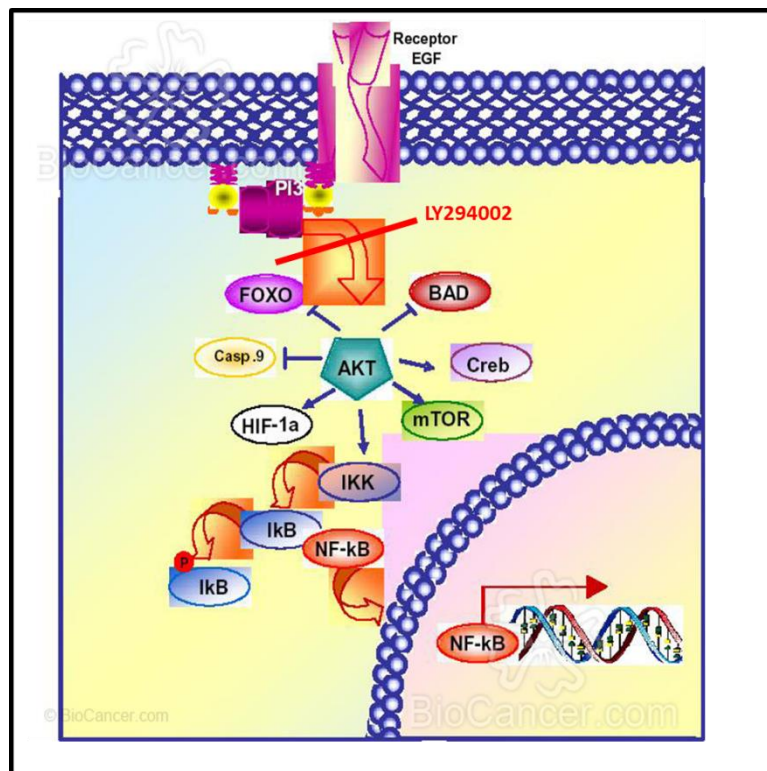


Figura 3.2. Esquema de la ruta de PI3K/Akt. Representación del punto de inhibición de esta ruta con el inhibidor LY294002 que actúa sobre PI3K.

En todos los ensayos, los controles se trataron con un volumen de DMSO 1% v/v, equivalente al añadido en las muestras con inhibidores, puesto que DMSO fue el disolvente utilizado para resuspenderlos.

3.2. Inhibición de rutas de apoptosis dependientes de caspasas.

Para estudiar si existía implicación de las caspasas en el proceso de apoptosis desencadenado por el estrés hipotérmico, se realizaron ensayos inhibiendo caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9. Los inhibidores utilizados fueron los siguientes:

Inhibidor	Nombre del inhibidor	Efecto inhibidor	Conc.	Casa comercial	Referencia
Inhibidor de serín-proteasas	AEBSF	Serín proteasas	25 μ M	Calbiochem	Wartenberg M et al., 2005.
Inhibidor de Caspasa 3	Z-DEVD-fmk	Caspasa 3	10 μ M	Calbiochem	Gollapud S y Gupta S, 2001.
Inhibidor de Caspasa 8	Z-IETD-fmk	Caspasa 8	10 μ M	Calbiochem	Zhang JY et al., 2007
Inhibidor de Caspasa 9	Z-LEHD-fmk	Caspasa 9, Caspasas 4,5	10 μ M	Calbiochem	Mantovani I et al., 2006.

Tabla 3.II. Inhibidores de rutas de inducción de apoptosis.

Los inhibidores se prepararon a las concentraciones previamente descritas en diversos artículos (disolviéndolos en DMSO) y se añadieron al cultivo celular 1 hora antes de exponer las células al tratamiento con frío. Este es el tiempo necesario para que el inhibidor pueda difundir hacia el interior celular y realizar su acción. En la **figura 3.3** se indica la molécula sobre la que actúa cada inhibidor utilizado en las vías intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis.

Los inhibidores de caspasa 3 y caspasa 8 son altamente específicos para dichas caspasas; en cambio, el inhibidor de caspasa 9 puede actuar en cierta medida sobre las caspasas 4 y 5. El compuesto AEBSF (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride) se utilizó como un inhibidor específico de enzimas serín proteasas para estudiar también la posible implicación de estas enzimas sobre el proceso de apoptosis estudiado. En todos los ensayos, los controles se trataron con DMSO 1% v/v, puesto que todos los inhibidores utilizados fueron resuspendidos en una disolución de dicha molécula.

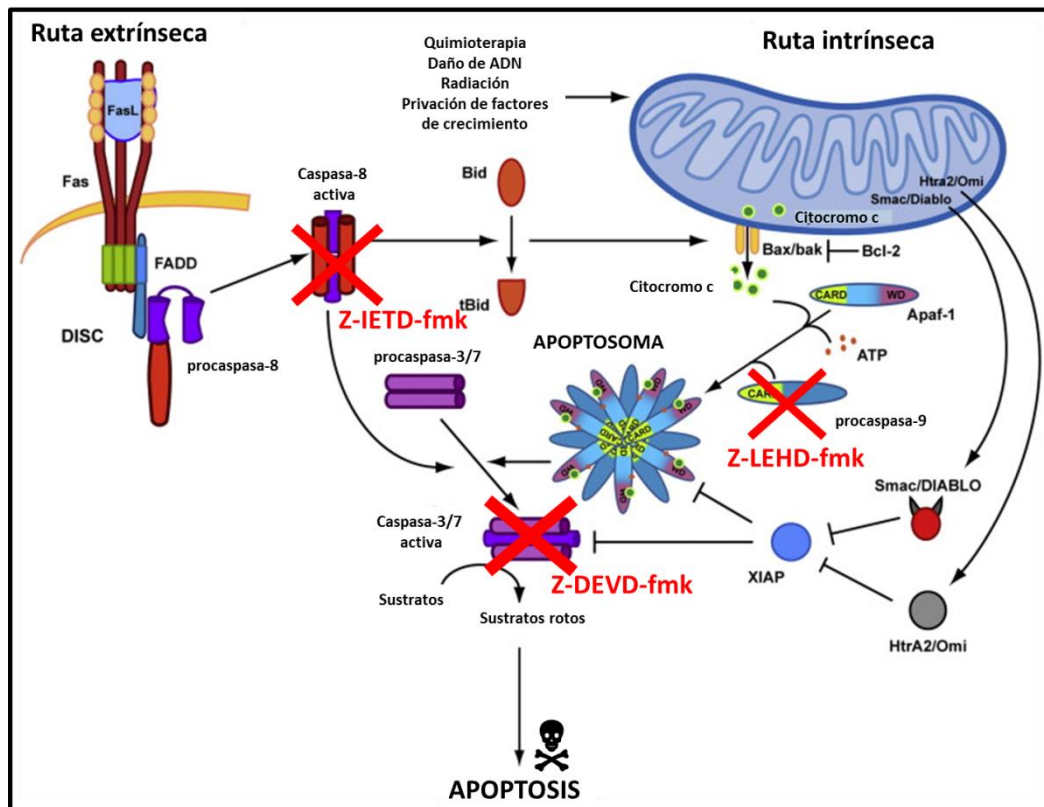


Figura 3.3. Esquema de la inhibición de caspasas y su influencia sobre las rutas de señalización de apoptosis intrínseca y extrínseca. En rojo aparecen los inhibidores de caspasas: Z-DEVD-fmk que actúa sobre caspasa 3 bloqueando las dos rutas; Z-IETD-fmk que actúa sobre caspasa 8 inhibiendo la vía extrínseca y Z-LEHD-fmk que actúa sobre caspasa 9 bloqueando la ruta intrínseca.

4. Detección de proteínas. Electro-inmunotransferencia (Western-blot).

4.1. Lisis celular con extractos celulares totales.

Para realizar la lisis, las células se lavaron dos veces con tampón PBS 1X estéril (PAA, Estados Unidos) y se centrifugaron a 270 g. A continuación se eliminó completamente el sobrenadante y las células se transfirieron a un tubo eppendorf de 1 ml, añadiéndose a cada muestra 80 μ L de tampón de lisis 1X, compuesto de:

- Agua bidestilada.
- Tampón de lisis 10X (Cell Signaling, Estados Unidos).
- PMSF (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a una concentración de 1 μ M.

Las células se incubaron con tampón de lisis durante 5 minutos a 4°C, y posteriormente se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 15.000 g. Finalmente, se recogió el sobrenadante que contenía la fracción proteica. La concentración de proteína se midió posteriormente mediante el ensayo de Bradford.

4.2. Cuantificación de proteínas. Ensayo de Bradford.

La cuantificación de proteína se realizó mediante el Método de Bradford (Bradford M.M., 1976). Este método se basa en el desplazamiento del máximo de absorbancia del colorante Azul de Coomasie Brillante o Reactivo de Bradford (Sigma-aldrich, Estados Unidos) desde 450 nm a 595 nm cuando forma complejos con proteínas. Como patrón de proteína se utilizó Albúmina de suero bovino (BSA) en una concentración de 2 mg/mL (Thermo Scientific-Pierce, Francia), con la que se elaboró una recta patrón representando la concentración de proteína frente a la absorbancia a 595 nm. Mediante la medida espectrofotométrica a 595nm y su posterior interpolación en la recta patrón, se determinó la concentración proteica de cada muestra.

4.3. Fraccionamiento de proteínas

Los extractos celulares se prepararon en alícuotas que contenían 15 µg de proteína total, y se les añadió un tampón de desnaturalización de proteínas (Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 5%, SDS (Dodecilsulfato sódico) 2%, azul de bromofenol 0,005% y β-mecaptoetanol al 5% como agente reductor [todos los reactivos son de Sigma-aldrich, Estados Unidos]) y agua bidestilada hasta completar un volumen de 20 µL. Posteriormente se calentaron estas alícuotas a 95°C durante 5 minutos en un bloque térmico (Grant-Boeckel scientific, Reino Unido) para favorecer la desnaturalización de las proteínas; de esta forma se obtuvieron alícuotas de cada muestra con las proteínas desnaturalizadas.

Se prepararon geles de SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), que constaron de un gel concentrador o *stacking* y un gel de separación o *running*.

El gel *running* es un gel de poliacrilamida al 10% ó 12%, dependiendo del tamaño de proteínas que se quieran observar. Para las proteínas de peso molecular pequeño (entre 10 y 30 kDa) se realizaron geles al 12% y para las de alto peso molecular (de 50 a 200 kDa) al 10%. Estos geles estaban compuestos por dH₂O, tampón Tris 1M con pH 8.8, mezcla de Acrilamida-bisacrilamida al 30% y detergente SDS 0,1% p/v, como agentes polimerizantes, PSA (Persulfato amónico) 0,1% p/v y TEMED (N,N,N',N' Tetrametiletilendiamina) 0,08% v/v (Todos los reactivos son de Sigma-

aldrich, Estados Unidos; excepto la mezcla de acrilamida-bisacrilamida de Amershan, Estados Unidos).

El gel *stacking* consiste en una mezcla de H₂O, tampón Tris- 1M con pH 6.8, mezcla de Acrilamida-bisacrilamida al 4% y detergente SDS 0,1% p/v, como agentes polimerizantes, PSA 0,1% p/v y TEMED 0,08% v/v y en él se realizan los pocillos para colocar las muestras. El número de pocillos utilizado fue de 10 o 15 dependiendo del número de muestras que se quisieran analizar en cada gel. .

La cantidad de proteína que se añadió a cada pocillo fue de 15 µg, excepto en algunos casos en los que la concentración de proteína obtenida fue muy baja, por lo que se utilizaron 10 µg. Como marcadores de peso molecular se utilizó la mezcla comercial denominada “Precision Plus Protein Standards, Dual Color” (Bio-RAD, Estados Unidos).

La electroforesis se realizó mediante el método descrito por Laemmli (1970) utilizando un equipo de electroforesis Miniprotean (Bio-RAD, Estados Unidos), usando un tampón de electroforesis o *running buffer* con la siguiente composición: Tris 20 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,1% p/v y ajustado a un pH de 8,7. La corriente eléctrica a la que se sometió el equipo fue de 70 V para concentrar las proteínas en el *stacking gel*, y de 120 V para separar las proteínas en el *running gel*.

4.4. Transferencia y revelado.

La detección de proteínas se realizó mediante electroinmunotransferencia, con el método descrito por Towbin (Towbin H. et al., 1979), y utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para cada proteína que se quería observar.

Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Inmobilon, Estados Unidos), mediante transferencia electroforética, consistiendo esta en enfrentar el gel que contiene las proteínas con la membrana de nitrocelulosa, y establecer un sándwich en el que en el centro queda el conjunto gel-membrana, rodeado de 3 capas de papel de filtro a ambos lados y 1 capa final de esponja. El sándwich de transferencia se colocó en un soporte Miniprotean (Bio-RAD, Estados Unidos) y se sometió a una corriente eléctrica de 90 V durante 1 hora y 30 minutos que atravesaba el gel y transfería las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, quedando éstas atrapadas en dicha membrana.

Finalmente, las membranas que contenían las proteínas se retiraron y se colocaron en cubetas donde se les añadió una solución de bloqueo compuesta de tampón fosfato PBS con detergente Tween-20 (Sigma-aldrich, Estados Unidos) al 0,05% y leche desnatada (Central Lechera Asturiana, España) al 0,5% p/v o BSA (Sigma-aldrich, Estados Unidos) al 0,2% p/v a temperatura ambiente y en agitación continua. Dicho bloqueo se realizó para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie de las membranas.

A continuación, las membranas se bañaron con un tampón PBS suplementado con Tween-20 y leche desnatada o BSA, idéntico a la solución de bloqueo, al que se le añadió el anticuerpo que reconocía la proteína que se deseaba estudiar, incubándose durante toda la noche en agitación continua y a una temperatura de 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS suplementado con Tween-20 al 0,05% de una duración de 10 minutos cada uno, después se incubó durante 1 hora con la solución de bloqueo suplementada con el anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) marcado con peroxidasa y, finalmente, se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBS-Tween; todos los lavados del segundo día se realizaron en agitación continua y a temperatura ambiente.

Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente, con la mezcla de reactivos A y B del kit de detección de western-blot ECLplus (Amersham, Estados Unidos; Thermo-Pierce, Estados Unidos) en una proporción 1:40. La mezcla de estos reactivos constituye un sustrato de peroxidasa del anticuerpo secundario, y se genera un producto quimioluminiscente. Para detectar la señal luminosa, se superpusieron sobre las membranas, películas de detección de quimioluminiscencia (Amersham, Estados Unidos) en oscuridad a distintos tiempos (desde pocos segundos hasta 1 hora), quedando impresionada en las películas la señal luminiscente de los anticuerpos. Estas películas se revelaron y fijaron en oscuridad bañándolas en líquido revelador (Ilford, Suiza) diluido en agua en una proporción 1:7 hasta que se observara la imagen deseada en la película y, posteriormente, bañándolas durante 2-5 minutos en líquido fijador (Ilford, Suiza) diluido en agua en una proporción 1:7.

Finalmente se realizaron 5 lavados con PBS-Tween de una duración de 15 minutos, antes de incubar las membranas con el siguiente anticuerpo. En los casos en

que fue necesario, se hicieron lavados de *stripping* antes de incubar con el siguiente anticuerpo. El tampón de *stripping* consistió en una solución ácida (NaCl 0,56 M; Tris 40 mM y beta-mercaptoetanol 0,1 M; pH=2,3) que favorece la ruptura de la unión antígeno anticuerpo, de manera que, aplicando el tampón de *stripping* tras el proceso de revelado, la misma membrana se pueda incubar durante varias veces sucesivas con anticuerpos que contengan distintas especificidades antigénicas. El procedimiento de *stripping* consiste en un lavado de 5 minutos con agua bidestilada, 3 lavados de 30 minutos con tampón de *stripping*, y 5 lavados de 10 minutos con PBS-Tween. Todos los lavados se realizaron a temperatura ambiente y en agitación continua.

4.5. Cuantificación y densitometría.

La cuantificación de las señales quimioluminiscentes de las películas de western-blot, proporcionales a la cantidad de proteína de la muestra, se densitometraron con los programas Scion Image (Scion Inc., Estados Unidos) e Image J (National Institute of Health, Estados Unidos). Estos programas informáticos realizan un análisis de cada calle del gel de western-blot indicando la intensidad de señal en cada banda proteica, además permiten acotar la zona de la proteína a medir y calcular el área de la zona acotada mediante integración matemática.

La cantidad de todas las proteínas estudiadas se corrigió dividiendo por la cantidad de una proteína que servía de control de carga y que corregía posibles errores debido a variaciones en el proceso de pipeteo de las muestras. Para p-ERK se usó como control de carga ERKt, para p-JNK se usó JNKt, para p-p38 se usó p38t, para las demás proteínas se usó como control de carga la proteína GAPDH.

Para la mayoría de los experimentos de células murinas se utilizó, como referencia para normalizar todos los resultados, la cantidad de proteína detectada en la muestra control de la línea celular L1210. En los ensayos de inhibición de rutas intracelulares, la referencia para la normalización fue la cantidad de proteína detectada en la muestra control (37°C) de cada tipo celular. En los western-blot realizados para determinar los niveles de expresión de la proteína MDR-1, la muestra de referencia fue el control de la línea celular L1210R. Para los experimentos con células humanas, la referencia de normalización fue el valor de proteína para la línea celular parental (IM-9); a excepción de la proteína MDR-1, para la que se utilizó como valor de normalización el obtenido en la línea celular IM-9R_{1,3}. Cada una de las muestras de

referencia utilizada para normalizar los resultados está indicada en las figuras correspondientes.

4.6. Anticuerpos utilizados.

Para estudiar la expresión y/o activación de proteínas intracelulares mediante western-blot se utilizaron los anticuerpos que se describen en la siguiente tabla:

Ruta/Proceso intracelular	Proteína	Dilución	Procedencia	Casa comercial	Nº catálogo	Referencia Bibliográfica
Señalización por rutas de MAPKs	p-SAPK / p-JNK (Thr 183/Tyr 185)	1:1000	rabbit	Cell signaling	9251S	Shukla A et al., 2001.
	SAPK / JNK	1:1000	rabbit	Cell signaling	9252	Lee EG et al., 2000.
	p-p38 (Thr180/Tyr182)	1:1000	rabbit	Cell signaling	9211S	Patrucco E et al., 2004.
	p38	1:1000	rabbit	Cell signaling	9212	Rossi A et al., 2000.
	p-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204 – Thr 185/Tyr 187)-R	1:1000-1:2000	rabbit	Santa Cruz	sc-16982-R	Xu H et al., 2001.
	ERK 2 (C-14)	1:1000-1:2000	rabbit	Santa Cruz	sc-154	Domina AM et al., 2000.
Expresión de Pg-p	MDR-1 (D-11)	1:1000	mouse	Santa Cruz	sc-55510	Cerezo D. et al., 2012
Rutas de inducción de apoptosis	Caspase-9	1:1000	rabbit	Santa Cruz	sc-8355	Kavitha K et al. 2012.
	Caspase-3 (H-277)	1:500 - 1:1000	rabbit	Santa Cruz	sc-7148	Baumgart A et al., 2010.
Proteínas de la familia Bcl-2	Bcl-xL	1:15000 – 1:25000	rabbit	BD Pharmingen	556361	Alexander-Miller MA et al., 1998.
	Bcl-2	1:6000	rabbit	BD Pharmingen	554279	Groesdonk HV et al., 2007.
	Bax	1:5000	rabbit	BD Pharmingen	554106	Stout BA et al., 2007.

	Mcl-1	1:5000	mouse	BD Pharmingen	559027	Doi K et al., 2012.
Controles de carga	GAPDH	1:10000-1:20000	rabbit	Sigma-aldrich	9545	Hobbs RP et al., 2011.
	Actina	1:1000 – 1:5000	rabbit	Sigma-aldrich	A2066	Ginguené C et al., 2010.
Anticuerpos secundarios	2º goat anti-rabbit IgG-HRP	1:5000-1:30000	goat	Santa Cruz	sc-2054	Lamacchia C et al., 2012.
	2º goat anti-mouse IgG-HRP	1:5000 – 1:20000	goat	Santa Cruz	sc-2055	Grabinski N et al., 2011.

Tabla 3.III. Anticuerpos utilizados para western-blot.

5. Medida de actividad caspasa 3.

La actividad Caspasa 3 se midió mediante el ensayo colorimétrico *CaspACE assay system* (Promega, Estados Unidos). Este kit proporciona reactivos para cuantificar la actividad enzimática caspasa 3, e incluye un sustrato colorimétrico y un inhibidor de las rutas de caspasas que inactiva caspasa 3 (Z-VAD-FMK). El sustrato colorimétrico (Ac-DEVD-pNA) se marca con el cromóforo p-nitroanilino (pNA), que es liberado del sustrato mediante la actividad enzimática caspasa 3; el pNA libre produce un color amarillo que puede ser medido por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. La absorbancia obtenida a dicha longitud de onda es proporcional a la actividad caspasa 3 que presenta la muestra.

Las células se incubaron a 4°C durante distintos tiempos (desde 0 hasta 8 horas), posteriormente se realizó un lisado de las células mediante ciclos de congelación-descongelación (se utilizó este sistema de lisis para no alterar la actividad enzimática caspasa 3) y se obtuvieron extractos celulares, en los que se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford (ver punto 4.2 de Material y Métodos) para corregir posibles desviaciones en la concentración celular y/o en la concentración de proteínas.

Primero se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas del compuesto pNA, midiendo su absorbancia a 405 nm; esta curva patrón se utilizó para extrapolar la absorbancia obtenida en las muestras experimentales. Se añadió el reactivo Ac-DEVD-pNA a los extractos celulares y se dejó incubar durante 4 horas agitando

regularmente. Se incluyeron pocillos en los que, además, se añadió el inhibidor de rutas de caspasas Z-VAD-FMK para asegurar que la coloración de la reacción era específica y, por tanto, se debía solamente a la actividad caspasa 3. Después de la incubación, se midió la absorbancia en un lector de placas Asys Jupiter (Asys, Austria) y se extrapoló el resultado de cada muestra en la curva patrón, obteniéndose así la concentración del compuesto pNA en cada muestra.

6. Funcionalidad de P-gp. Medida de la actividad extrusora de fármacos.

La funcionalidad de P-gp y otras bombas de extrusión de fármacos no se puede estudiar de forma directa, por lo que se tiene que estudiar de forma indirecta midiendo la acumulación celular de moléculas fluorescentes que, además, sean sustratos de la bomba. Tres moléculas que cumplen estas características y que por tanto se utilizan para estudiar la actividad extrusora de P-gp son DNM, rhodamina 123 y JC1 (Legrand O. et al., 2001; Altenberg GA et al., 1994). En este trabajo se utilizó la tinción con rhodamina 123 para estudiar la funcionalidad de P-gp, puesto que permitía una mejor discriminación entre células parentales (no expresan P-gp) y células con fenotipo MDR (expresan P-gp).

Para determinar los niveles de acumulación de rhodamina 123 en los distintos tipos celulares estudiados se procedió a la incubación de las células con dicho compuesto (rho, concentración final de 0,5 μM), agitando cada 15 minutos aproximadamente, durante 1 hora a 37°C. A continuación las células fueron sometidas a estrés hipotérmico durante distintos tiempos y, posteriormente, se recogieron las células y se analizó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. En este caso, la acumulación se relaciona directamente con la fluorescencia de color verde que emiten las células, que se midió con los citómetros FAC-Sort y FAC-Scalibur (Becton-Dickinson, Estados Unidos).

7. Silenciamiento de proteínas.

El silenciamiento de ARN consiste en la utilización de ARNs silenciadores o siARN (short/small interfering ARNs), que se unen de forma específica a los ARN mensajeros (ARNm) que codifican para la proteína que se pretende silenciar, impidiendo su traducción. Por lo tanto, la célula deja de expresar la proteína diana. En la **figura 3.4** se puede observar un esquema de cómo funcionan los oligonucleótidos silenciadores de ARN en el interior celular.

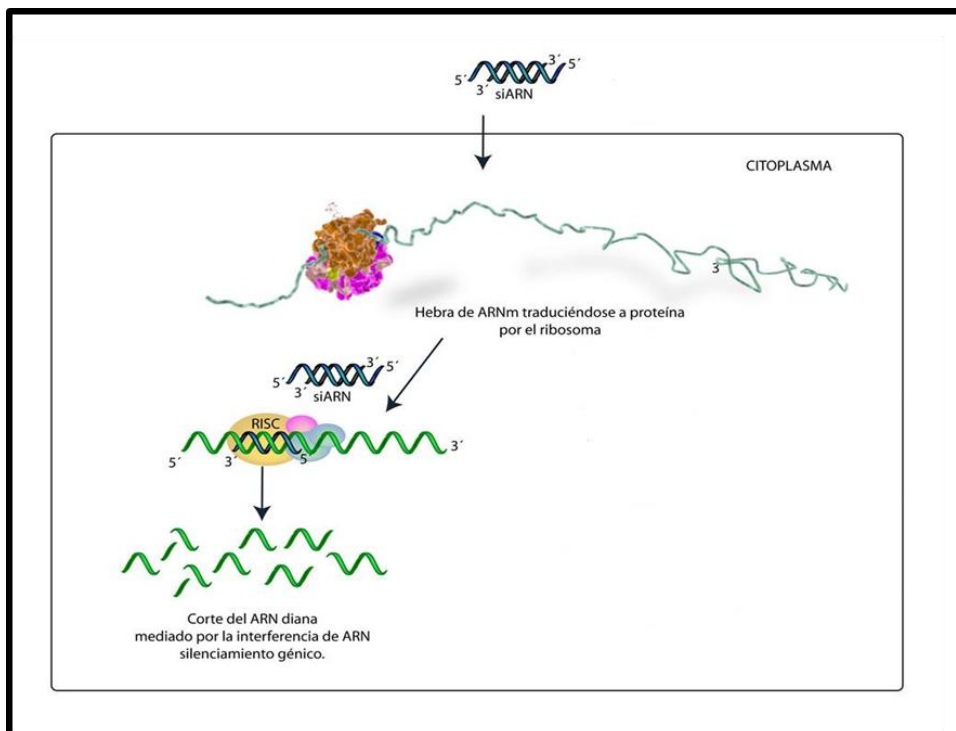


Figura 3.4. Dibujo representativo del proceso de silenciamiento de ARNm. Los siARN se introducen en el interior celular, en el citoplasma, y se unen al ARNm específico sobre el que actúan, promoviendo su corte y degradación. www.flagellum.wordpress.com/2009

Los siARN utilizados fueron los que se presentan en la siguiente tabla:

Nombre del silenciador	Proteína silenciada	Conc. silenc.(μ M)	Conc. en la muestra(μ M)	Casa comerc.	Referencia
siARN (Abcb1b)	Pg-p 1a/ Abcb1a	100	4	Ambion	Sin ref.
siARN (Abcb1b)	Pg-p 1b/ Abcb1b	100	4	Ambion	Sin ref.

siARN (Bcl-xL)	Bcl-xL	100	2	Ambion	Sin ref.
siARN(Bcl-2)	Bcl-2	100	4	Ambion	Sin ref.
siARN(Bax)	Bax	100	4	Ambion	Sin ref.
siARN-NC	Ninguna proteína	100	4	Ambion	Sin ref.

Tabla 3.IV. Silenciadores de ARNm utilizados.

Los siARN se prepararon disolviéndolos en agua libre de enzimas ARNasas a una concentración de 100 μM y se almacenaron en pequeñas alícuotas (10-20 μL) a -20°C. No se encontraron referencias bibliográficas que hubieran utilizado estos silenciadores de ARN, pero si fueron validados por la casa comercial.

Para realizar dicha técnica, las células se pusieron previamente en cultivo durante varios días y, 24 horas antes de la realización de la técnica, se cultivaron a una concentración de 3×10^5 células por mililitro para conseguir que se encontraran en fase de crecimiento exponencial en el momento de realizar la electroporación. Para cada muestra se utilizaron 1×10^6 células, a las que se les realizó un lavado con PBS 1X estéril. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 100 μl de una mezcla de tampón de nucleofección (Ambion, y Bio-Rad, Estados Unidos) y de medio de cultivo incompleto en una proporción 1:1. A continuación se cogió un volumen de 2 o 4 μl de cada disolución de siARNs (ver tabla adjunta) y se añadió a la mezcla formada por el pellet celular (1×10^6 células) y los 100 μl de tampón de electroporación (50 μl) y medio incompleto (50 μl). La mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación (Sigma-aldrich, Estados Unidos), que se colocó en un nucleofector AMAXA (Lonza, Alemania) para ser sometida al pulso eléctrico previamente seleccionado. La aplicación de pulsos eléctricos controlados en las células tiene por objeto crear pequeños poros en sus membranas, permitiendo así la entrada de los oligonucleótidos de siARN al interior de la célula.

Las muestras consistieron en:

- 1- Un control negativo (Sin tratamiento) en el que las células no fueron sometidas a electroporación.

- 2- Un control negativo en el que las células fueron sometidas a todo el proceso de silenciamiento pero sin añadir oligonucleótido siARN (*Mock*).
- 3- Un control negativo de silenciamiento de proteína (siARN Control negativo) en el que las células fueron incubadas con un siARN que no silencia ninguna proteína conocida.
- 4- Muestras a las que se añadieron oligonucleótidos siARNs específicos de las siguientes proteínas: P-gp1a, P-gp1b (siAbcb1a, siAbcb1b) y proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-2 y Bax).

Las muestras *Mock* se utilizaron como control de los cambios (muerte celular, etc.) ocurridos en las células como consecuencia del proceso de nucleofección. Todos los resultados obtenidos con la técnica de silenciamiento fueron referidos a los obtenidos con las muestras tratadas con el oligonucleótido siARN control.

Tras la nucleofección, las células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas, tiempo suficiente para que recuperaran la integridad de la membrana y el crecimiento celular. Éste fue el punto de partida (tiempo=0) para realizar los distintos experimentos basados en el silenciamiento de proteínas, como obtención de extractos celulares y western-blot, tratamiento de las células con estrés hipotérmico, ensayos de MTT y de acumulación de rhodamina, etc.

8. Determinación de citocinas.

El análisis de producción de citocinas se realizó con el kit *Mouse Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex* (eBioscience, Estados Unidos), que consiste en un sistema de detección analítica basado en la utilización de pequeñas esferas para citómetro que permite la detección de las citocinas de ratón GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF α mediante citometría de flujo.

Los ensayos basados en utilización de esferas para citometría de flujo utilizan bolas de un polímero resistente de dos tamaños distintos. Cada grupo de bolas, específicas de una citocina concreta, lleva asociado una cantidad concreta de fluoróforos que emiten en FL3. Además, tiene en su superficie anticuerpos monoclonales que reconocen una única citocina, de manera que las citocinas se pueden dividir en dos

grupos distintos atendiendo al tamaño de las bolas que las reconocen y, dentro de cada tamaño en cinco tipos distintos atendiendo a la intensidad de fluorescencia en FL3 asociada a cada bola concreta y, por tanto, a cada tipo de citocina. El kit también incluye anticuerpos específicos para cada citocina conjugados con biotina, streptavidina-ficoeritrina (*Streptavidin-PE*) que permiten, atendiendo a la intensidad de fluorescencia observada en FL2, cuantificar la cantidad de citocina en la muestra. Adicionalmente el kit dispone de citocinas preparadas para realizar la curva patrón. En la **figura 3.5** se puede observar un esquema que muestra cómo funcionan los ensayos de citometría basados en bolas de captura.

El citómetro permite analizar los datos de la siguiente forma: el tamaño de las esferas y la intensidad de fluorescencia en FL3 permite diferenciar las distintas citocinas, y la fluorescencia en FL2 indicará la cantidad de citocina presente en la muestra. Todos los datos de fluorescencia se extrapolan en la recta patrón de la citocina correspondiente, obteniéndose la concentración de cada una de las citocinas presentes en la muestra.

Mediante este sistema se realizó la determinación de citocinas, intracelulares y secretadas al medio de cultivo en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6, en condiciones de cultivo fisiológicas (37°C), de estrés hipotérmico (4°C) y durante el tratamiento con DNM. Los niveles de citocinas se expresan en función de la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras analizadas y/o del número de células utilizado.

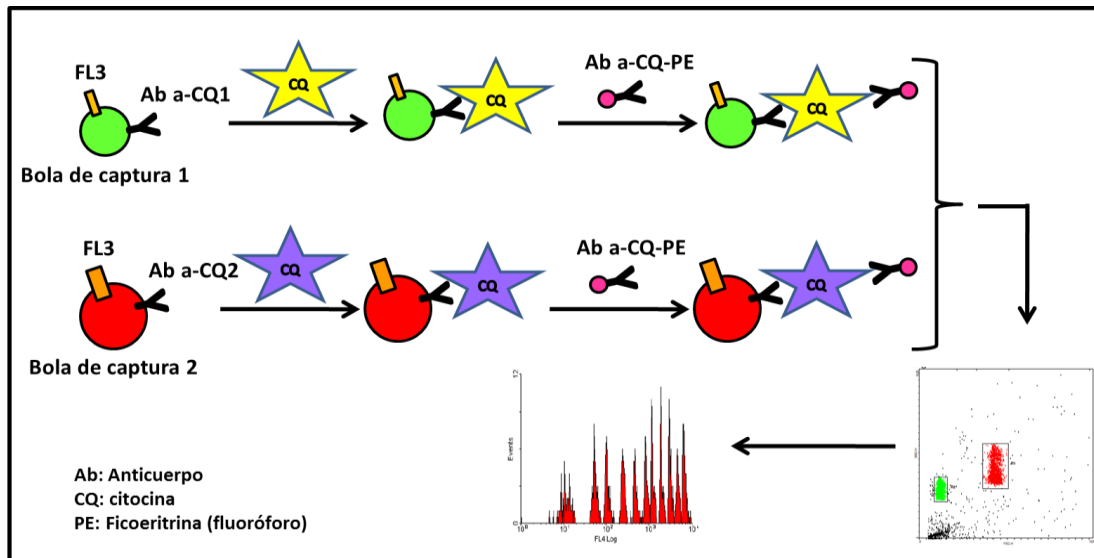


Figura 3.5. Esquema del funcionamiento del inmunoanálisis basado en esferas/bolas de captura por citometría de flujo.

9. Obtención de sublíneas celulares humanas resistentes a daunomicina.

Con objeto de disponer en el laboratorio de un modelo celular humano equivalente al de ratón y poder comprobar si los procesos observados en las células murinas son válidos para el modelo humano, se utilizaron células leucémicas humanas IM-9.

Para la obtención de células con fenotipo MDR, la línea parental IM-9 (de fenotipo sensible al tratamiento con daunomicina), se cultivó en presencia de concentraciones crecientes del fármaco (daunomicina) que oscilaron entre 0,1 y 4,0 μM . Tras 5 semanas de cultivo a dichas dosis, se seleccionaron las células que resistían la máxima concentración del fármaco. Dichas células resistentes se volvieron a exponer a la misma concentración de daunomicina a la que habían sido capaces de proliferar y a concentraciones crecientes a partir de dicha concentración de partida, para así ir incrementando paulatinamente el nivel de resistencia al fármaco.

Las exposiciones a daunomicina consistieron en ciclos de exposición al fármaco y descanso de 5 semanas, seguidas de 2-3 semanas sin tratamiento para la recuperación de las células seleccionadas. Partiendo de células sensibles al fármaco, se exponían durante 1 semana a dosis de daunomicina, seguidas de 1 semana de recuperación sin fármaco, los cultivos supervivientes volvieron a pasar por el mismo proceso de tratamiento-descanso 2 veces más, dejando las últimas células supervivientes con una

recuperación de semanas. A partir de aquí, se volvía a repetir el mismo ciclo, pero teniendo como concentración basal del fármaco la concentración máxima del paso anterior, y realizando concentraciones superiores para aumentar el grado de resistencia de los cultivos con el mismo patrón de exposiciones que la vez anterior. Estos ciclos se repitieron durante un periodo de 2 años hasta conseguir los fenotipos resistentes establecidos. En la **figura 3.6** se puede ver un esquema representativo del funcionamiento de los ciclos realizados de exposición a daunomicina.

Después de seleccionar los fenotipos resistentes, los cultivos se sometían a pulsos de 2 días de exposición al fármaco para comprobar su resistencia y eliminar posibles células que no fueran resistentes o que hubieran revertido el fenotipo resistente.

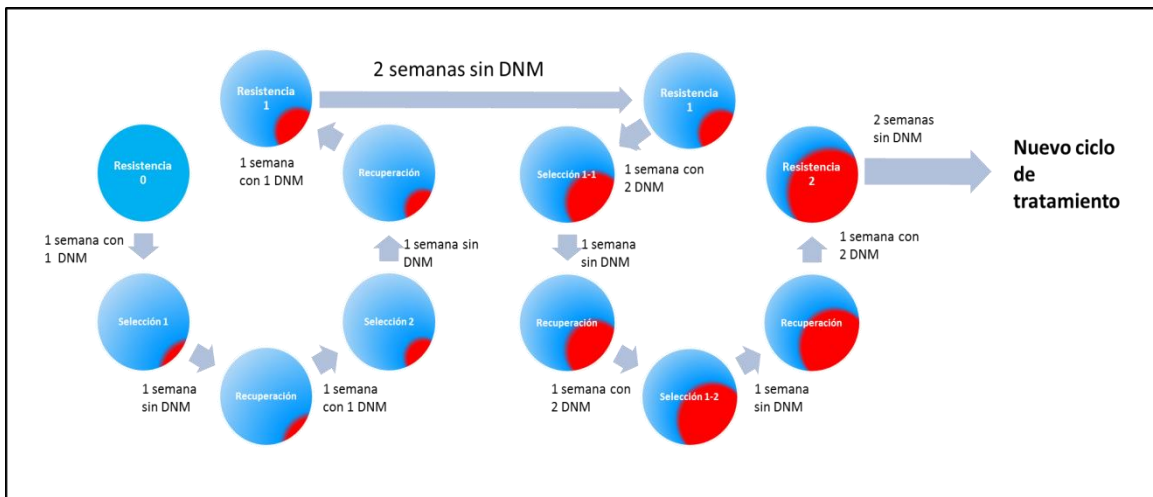


Figura 3.6. Esquema de los ciclos de tratamiento con DNM en la línea celular IM9 para obtener fenotipos resistentes. Representación del proceso de obtención de líneas celulares resistentes a tratamiento con el fármaco DNM. En azul se indican las células sensibles al fármaco y en rojo el aumento progresivo del grado de resistencia.

10. Análisis estadístico y representación de datos.

El test estadístico utilizado fue el de la t de Student para comparar los datos obtenidos en cada tipo celular. El programa utilizado para realizar este test fue SPSS 15.0 (IBM, Estados Unidos) considerándose los siguientes niveles de significación estadística: $P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,001$.

Las gráficas muestran, en todos los casos, la media de los ensayos realizados \pm error típico de la media. El programa utilizado para realizar las representaciones

gráficas fue Microsoft Excell del paquete informático Microsoft Office 2010 (Microsoft, Estados Unidos).

Los datos de citometría fueron analizados con el Software CellQuest (Becton-Dickinson, Estados Unidos) y las figuras de los análisis citométricos fueron realizadas con el programa de representación de citometría CellQuest. El análisis de citrometría de los ensayos de producción de citocinas se realizó con el Software de FlowCytomics (eBioscience, Estados Unidos).

RESULTADOS

- 1. Características de las sublíneas celulares murinas resistentes a fármacos.**
 - 1.1 Respuesta de células leucémicas murinas a estrés por daunomicina.**
 - Ensayo de MTT.**
 - 1.2. Expresión de glicoproteína P (P-gp, MDR-1, Abcb1).**
- 2. Sensibilidad colateral al frío en células leucémicas murinas con fenotipo MDR.**
- 3. Caracterización de la ruta de muerte celular inducida por exposición a bajas temperaturas en células con fenotipo MDR.**
 - 3.1. Determinación del tipo de muerte celular: apoptosis.**
 - 3.2. Implicación de las caspasas en la muerte celular inducida por estrés hipotérmico.**
 - 3.2.1. Determinación de la expresión de caspasa 3 activa mediante western-blot.**
 - 3.2.2. Ensayo colorimétrico para determinar actividad enzimática de caspasa 3.**
 - 3.2.3. Utilización de inhibidores farmacológicos específicos de caspasas.**
- 4. Papel de glicoproteína P en la sensibilidad colateral al frío en células murinas con fenotipo MDR.**
 - 4.1. Expresión de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia.**
 - 4.2. Funcionalidad de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia. Acumulación de rhodamina 123.**
 - 4.3. Efecto del silenciamiento de P-gp con oligonucleótidos de ARN sobre viabilidad celular y resistencia a múltiples fármacos.**
 - 4.3.1. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la supervivencia celular y los niveles de caspasa 3.**
 - 4.3.2. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la resistencia a fármacos.**
- 5. Contribución de las proteínas de la familia Bcl-2 a la supervivencia de las líneas celulares leucémicas sensibles y resistentes a fármacos.**
 - 5.1 Niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en líneas celulares leucémicas de ratón sensibles y resistentes a fármacos.**
 - 5.2 Contribución de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 a la supervivencia celular en condiciones fisiológicas y de estrés.**

- 5.3 Efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 sobre los niveles de caspasa 3 activa.
 - 5.4 Efecto del silenciamiento de P-gp sobre los niveles de proteínas de la familia Bcl-2.
- 6. Señalización intracelular. Contribución de la familia de MAPK a la muerte celular inducida por frío en células con fenotipo MDR.
 - 6.1. Cinética de activación de proteínas MAPK en células leucémicas sensibles y resistentes a fármacos cultivadas a 4°C.
 - 6.2. Efecto de los inhibidores de MAPK y PI3K/Akt sobre la sensibilidad colateral al frío de células leucémicas con fenotipo MDR.
 - 6.2.1 Viabilidad en condiciones de estrés por frío.
 - 6.2.2 Expresión de P-gp.
 - 6.3. Redes de comunicación intracelular entre MAPK en condiciones de estrés por frío.
- 7. Producción de Citocinas. Papel de las citocinas en respuesta a estrés celular.
 - 7.1. Determinación de citocinas intracelulares.
 - 7.2. Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo.
- 8. Obtención de líneas leucémicas humanas resistentes a daunomicina.
 - 8.1. Características morfológicas.
 - 8.2. Respuesta al estrés por tratamiento farmacológico.
 - 8.3. Expresión y actividad de P-gp.
- 9. Sensibilidad colateral al frío en células leucémicas humanas con fenotipo MDR.
- 10. Expresión de proteínas implicadas en supervivencia/muerte celular en las líneas celulares humanas, sensibles y resistentes a fármacos.
 - 10.1 Expresión de caspasas activas.
 - 10.2 Expresión de proteínas de la familia Bcl-2

1. Características de las sublíneas celulares murinas resistentes a fármacos.

El primer paso en la realización de este trabajo fue comprobar la respuesta de las líneas celulares murinas utilizadas frente al tratamiento con un fármaco antineoplásico y comprobar la expresión de la proteína MDR-1 (Abcb1, glicoproteína P o P-gp).

1.1 Respuesta de células leucémicas murinas a estrés por daunomicina.

Ensayo de MTT.

Con objeto de comprobar la resistencia/sensibilidad de nuestro modelo de líneas celulares leucémicas a un tratamiento farmacológico con DNM, se realizaron incubaciones de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 con DNM a distintas concentraciones durante un tiempo de 24 horas y se observó la supervivencia celular a través de la técnica de MTT. A partir de estos resultados se calculó la IC₅₀ de los tres tipos celulares estudiados.

En la **figura 4.1** se puede observar el resultado de estos ensayos, en los que las líneas celulares fueron incubadas con dosis crecientes de DNM durante un tiempo de 24 horas. Así, las dosis que se eligieron para la línea celular L1210 oscilaron entre 0,2 μM y 1,5 μM ; para la línea celular L1210R estuvieron comprendidas entre 2,5 μM y 25,0 μM ; y para la línea celular CBMC-6 se utilizaron concentraciones comprendidas entre 1,0 μM y 15,0 μM . Como se puede observar en dicha figura, las células L1210 mueren con dosis bajas del fármaco, sobreviviendo sólo la mitad de la población entre las dosis de 0,6 μM y 0,8 μM y sobreviviendo menos del 20% de la población con la dosis de 1,5 μM ; en las células L1210R, en cambio, sobrevivió más de la mitad de la población con la dosis de 15 μM y con la dosis de 25 μM sobrevivió más del 20% de la población celular; las células CBMC-6 mostraron un comportamiento intermedio, sobreviviendo más de la mitad de la población con la dosis de 5 μM y aproximadamente el 20% de la población con la dosis de 12,5 μM .

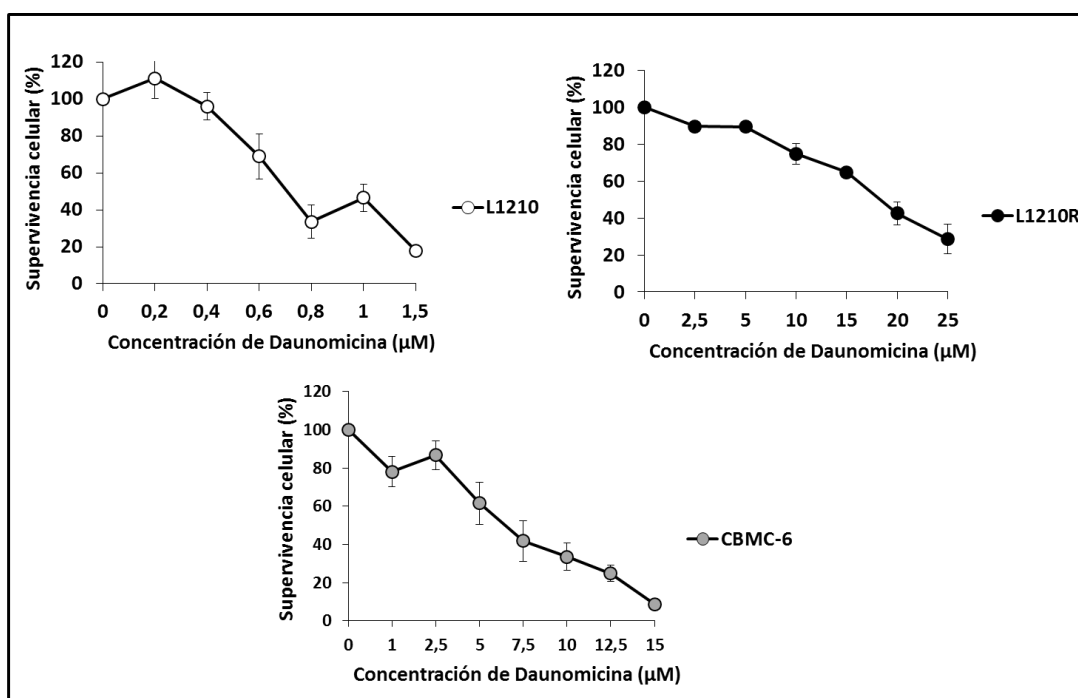


Figura 4.1. Supervivencia de las líneas celulares leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6, cultivadas con distintas dosis de Daunomicina. Representación gráfica del porcentaje de muerte celular medido con la técnica de MTT después de un tratamiento de 24 horas con distintas dosis de daunomicina (DNM). Las barras de error representan \pm error típico de la media. N=5.

Para establecer una comparación directa entre los grados de resistencia de cada uno de los tres tipos celulares estudiados, se calculó la IC_{50} (dosis del fármaco que produce la muerte de la mitad de la población celular) y el grado de resistencia (índice que resulta de dividir el valor de IC_{50} de una línea celular resistente por el valor de IC_{50} de la línea parental sensible) de las líneas celulares con fenotipo MDR (L1210R y CBMC-6) comparado con la línea celular sensible a quimioterapia (L1210). En la **tabla 4.I** y **figura 4.2** se muestra que, ante una exposición al fármaco de 24 horas, la IC_{50} fue de $0,79 \pm 0,11 \mu\text{M}$ para la línea celular L1210, $18,25 \pm 1,12 \mu\text{M}$ para la línea celular L1210R y $7,85 \pm 1,06 \mu\text{M}$ para la línea celular CBMC-6. En cuanto al índice de resistencia (IR) de las líneas celulares, se muestra en la **tabla 4.I** que las células L1210R presentan un valor de 23,1 y las células CBMC-6 de 9,9.

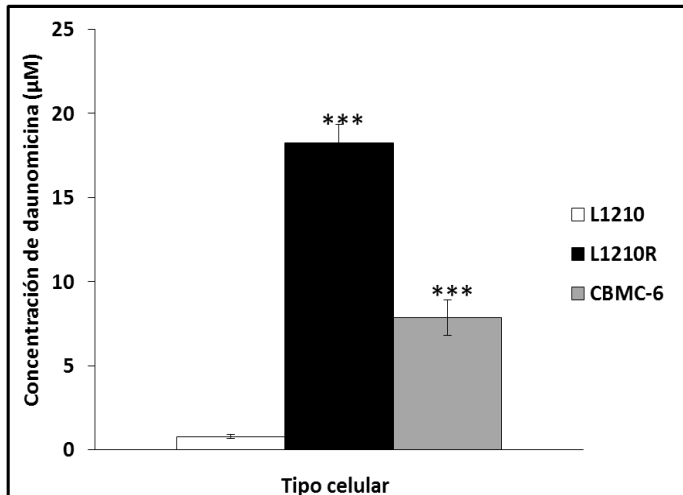


Figura 4.2. Valores de IC₅₀ de las líneas celulares leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas en presencia de Daunomicina. Representación gráfica de los valores de IC₅₀ de cada tipo celular estudiado después de un tratamiento de 24 horas con daunomicina (DNM). Las barras de error representan ± error típico de la media. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de *** $P < 0,001$. N=5.

Línea celular	IC ₅₀	IR
L1210	0,79 ± 0,11	1,00
L1210R	18,25 ± 1,12	23,10
CBMC-6	7,85 ± 1,06	9,94

Tabla 4.1. Valores de IC₅₀ e IR (índice de resistencia) obtenidos para las líneas celulares leucémicas murinas incubadas con DNM. Las líneas celulares (L1210, L1210R y CBMC-6) fueron incubadas en presencia de dosis crecientes de DNM y se determinaron los valores de la IC₅₀ e IR para cada una de ellas. IC₅₀ es la dosis de DNM que provoca la muerte de la mitad de la población en un tratamiento de 24 horas, el IR es un índice que se calcula dividiendo la IC₅₀ de la línea celular resistente entre la IC₅₀ de la línea celular sensible (si es mayor de 3 se puede considerar a esa línea celular como resistente). N=5.

1.2. Expresión de glicoproteína P (P-gp, MDR-1, Abcb1).

Se realizó un análisis de la expresión de la proteína P-gp en cada uno de los tipos celulares (**figura 4.3**) mediante la técnica de western-blot. Como ya se ha descrito previamente (Castro-Galache MD et al., 2003), los resultados mostraron que las células sensibles L1210 no expresan dicha proteína, mientras que las células resistentes L1210R y las células transfectadas, CBMC-6, expresan niveles detectables de P-gp aunque con distinta intensidad. Así, el análisis de los resultados mediante densitometría de las bandas obtenidas en el western-blot, mostró que la expresión de la proteína P-gp era, aproximadamente, 2,5 veces mayor en la sublínea celular L1210R respecto a la sublínea celular CBMC-6 cuando ambos tipos celulares se encontraban en condiciones fisiológicas de cultivo (37°C).

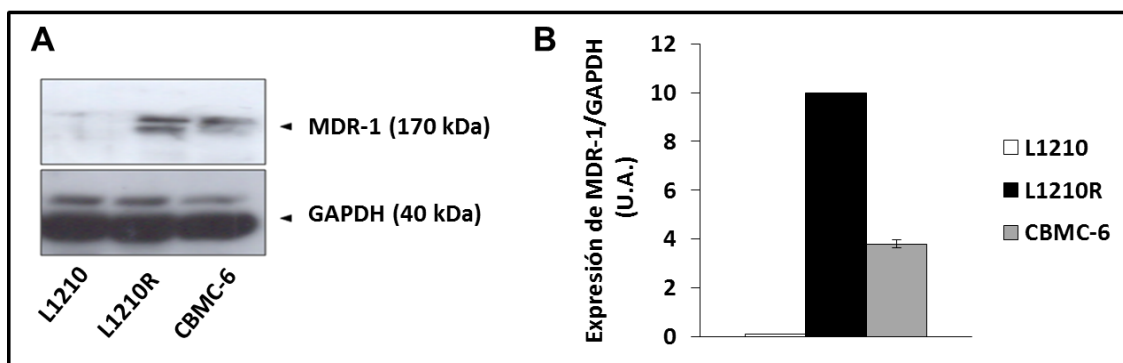


Figura 4.3. Expresión basal de la proteína MDR-1 en líneas celulares leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6.

(A) Western blot representativo en el que se muestran los niveles de expresión de las proteínas MDR-1 y GAPDH (control de carga), la normalización del densitometrado se realizó respecto al valor obtenido para las células L1210R. (B) Niveles de expresión de la proteína MDR-1 relativa a la expresión de GAPDH expresados en unidades arbitrarias (A.U.). Las barras de error representan \pm error típico de la media. N=7.

2. Sensibilidad colateral de células con fenotipo MDR a bajas temperaturas.

Nos propusimos encontrar algún estímulo inductor de estrés capaz de desencadenar muerte celular de forma preferente en las líneas celulares con fenotipo MDR y no en la línea parental (sensible a fármacos). Para ello, sometimos las líneas celulares leucémicas a distintos estímulos inductores de estrés como irradiación gamma, privación de SBF, estrés hipotérmico, etc. De entre los distintos estímulos de estrés utilizados, encontramos que la incubación a una temperatura de 4°C provocaba la muerte celular en las líneas celulares con fenotipo MDR, pero no en la línea parental. Así, la observación microscópica de las células L1210, L1210R y CBMC-6 mostraba de forma patente la diferente viabilidad de dichas células cuando se cultivaron a una temperatura de 4°C durante 24 horas. La [figura 4.4](#) (imagen procedente de la Tesina de Miriam Lencina Guardiola, Universidad de Murcia, 2011) muestra las imágenes de cultivos de las líneas leucémicas de ratón cultivadas a 37°C y a 4°C. Como se puede observar en dichas imágenes, tras la incubación de las líneas celulares a 4°C durante 24 horas, la viabilidad de la línea celular L1210 apenas se ve afectada, observándose que la inmensa mayoría de las células del cultivo aparecen refringentes a la luz y con la membrana celular intacta; sin embargo, los cultivos de las líneas celulares con fenotipo MDR (L1210R y CBMC-6) muestran que la inmensa mayoría de las células han sufrido un proceso de muerte celular, siendo este efecto más evidente en el cultivo de células L1210R (en el que no se observa ninguna célula viable) que en el de las células CBMC-6 (donde es posible observar un pequeño número de células viables). Estas

observaciones permitieron plantear que, mientras la línea parental (L1210, sensible a daunomicina) mantiene su viabilidad a una temperatura de 4°C, las líneas celulares con fenotipo MDR son más susceptibles que la parental y sufren un proceso de muerte celular cuando se cultivan a baja temperatura (4°C) durante 24 horas.

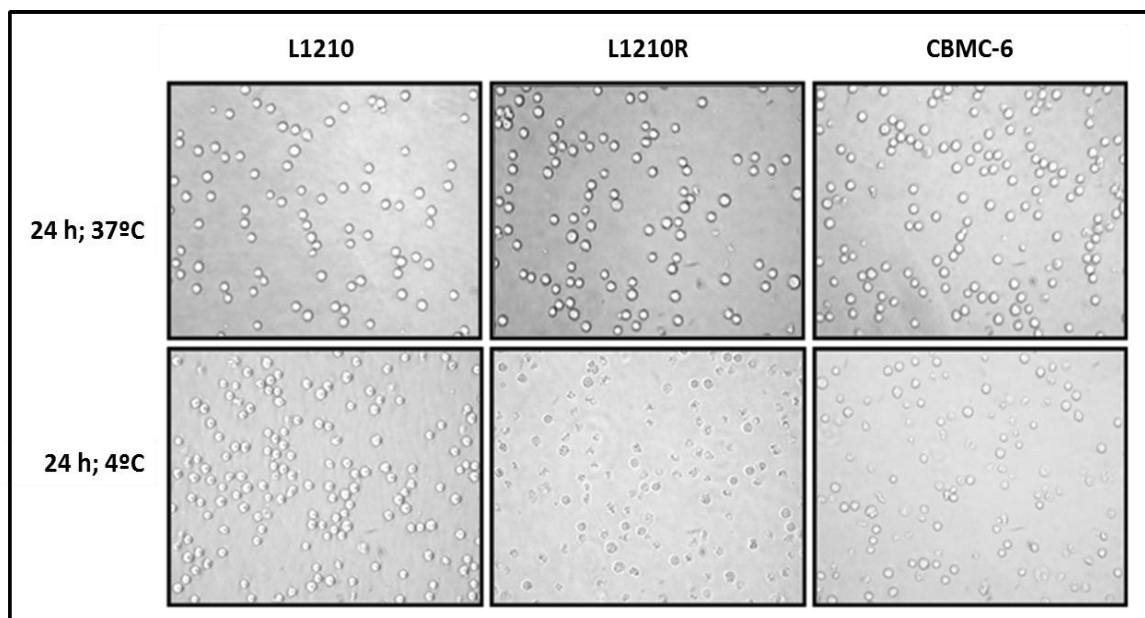


Figura 4.4. Cambios microscópicos producidos por estrés hipotérmico. Observación con microscopio óptico de la integridad celular de las líneas leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 después de 24 horas en cultivo a 37°C y a 4°C. Nótese la pérdida de integridad celular de los tipos celulares L1210R y CBMC-6 después de 24 horas de cultivo en condiciones de estrés hipotérmico. Tesina de Miriam Lencina Guardiola; Cerezo D. et al., 2012.

Con el fin de cuantificar la muerte celular producida en los tres tipos celulares por exposición a bajas temperaturas, se realizaron cultivos de células L1210, L1210R y CBMC-6 y se incubaron durante 24 horas a 4°C. Seguidamente, se tomaron muestras de los cultivos a distintos tiempos, analizándose los niveles de muerte celular mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis mediante citometría de flujo. En la **figura 4.5** se representa la evolución de la muerte celular en frío de los tres tipos celulares a los tiempos de 0 h, 4 h, 8 h, 12 h y 24 h, pudiendo observarse que los tres cultivos parten de una situación inicial similar. En las células L1210 los niveles de muerte celular se mantienen constantes a lo largo de todo el período de exposición al frío, mostrándose un ligero aumento únicamente a las 24 horas de incubación a 4°C ($P<0,05$). En las células L1210R, se observa un incremento en la muerte celular a las 8 horas de exposición al frío, llegando a alcanzar entre 80 y 90% de muerte celular tras 24 horas de cultivo bajo estrés hipotérmico. El aumento de la muerte celular era estadísticamente significativo a tiempos de 8 h, 12 h y 24 h con un valor de $P<0,001$. En

las células CBMC-6, el aumento de la muerte celular comienza a las 12 h, alcanzándose valores de entre 55 y 65% tras 24 h de exposición al frío, dicho aumento fue estadísticamente significativo ($P<0,05$ y $P<0,001$ respectivamente).

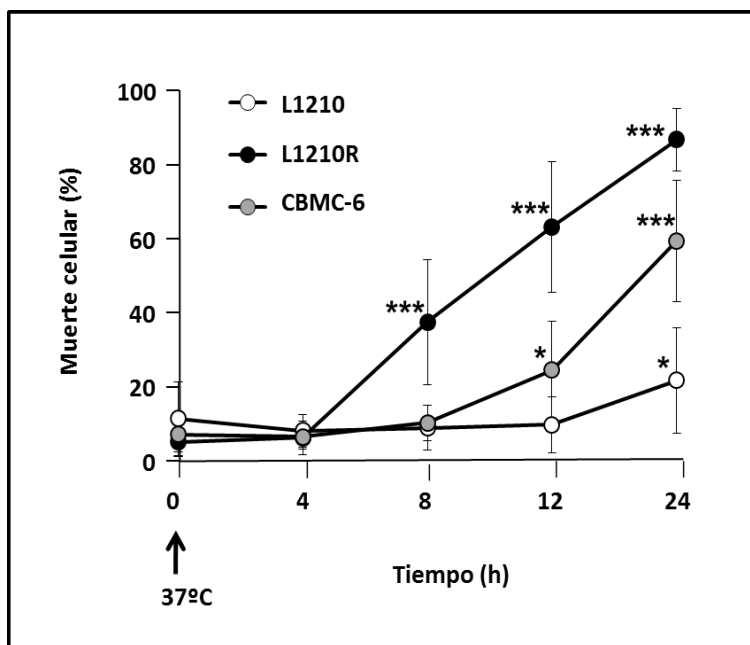


Figura 4.5. Muerte celular en líneas leucémicas cultivadas a distintos tiempos en condiciones de estrés hipotérmico. Las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 fueron cultivadas a 4°C durante 24 h y se analizaron los porcentajes de muerte celular a distintos tiempos de exposición a bajas temperaturas mediante tinción con ioduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N=5. (Tesina de Miriam Lencina Guardiola, 2011. Cerezo D. et al., 2012).

3. Caracterización de la ruta de muerte celular inducida por exposición a bajas temperaturas en células con fenotipo MDR.

3.1. Determinación del tipo de muerte celular: apoptosis.

Con objeto de confirmar los resultados de muerte celular anteriores y determinar si el mecanismo de dicha muerte podría consistir en un proceso de apoptosis, se analizó el ciclo celular de las líneas celulares incubadas en condiciones de estrés hipotérmico (4°C). Para ello, las células (L1210, L1210R y CBMC-6) fueron cultivadas en frío a distintos tiempos (entre 0 y 48 horas), después se tiñeron con ioduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo (tal como se describe en la sección 2.1 de Materiales y métodos). Los resultados (**figura 4.6**) muestran que, tras 12 horas de incubación a 4°C, las células L1210R y CBMC-6 sufren una parada del ciclo celular en G1, así como una disminución de dicho pico, coincidente con la aparición de un hombro en el contenido de ADN menor que G1 (pico subG1, señalado con flechas), característico de un proceso de apoptosis tardío. Conforme avanzó la exposición al frío, aumentó el porcentaje de células en proceso de apoptosis, incrementándose el

porcentaje de células contenidas en el pico subG1 desde un 4,6% basal en las células L1210R, hasta un 17,4% en el tiempo 24 horas y un 35,3% a las 48 horas, paralelamente a la disminución y desaparición del pico G1. Una evolución similar presentaron las células CBMC-6, en las que el porcentaje de células en el pico subG1 se incrementó desde el 5,2%, hasta el 22,1% a las 24 horas y hasta el 30,7% a las 48 horas. Por otra parte, las células L1210 tendieron a acumularse en el pico que representa la fase G1-S, y no presentaron un hombro significativo en subG1 después de la incubación a bajas temperaturas (5,4% después de 24 horas y 9,2% después de 48 horas).

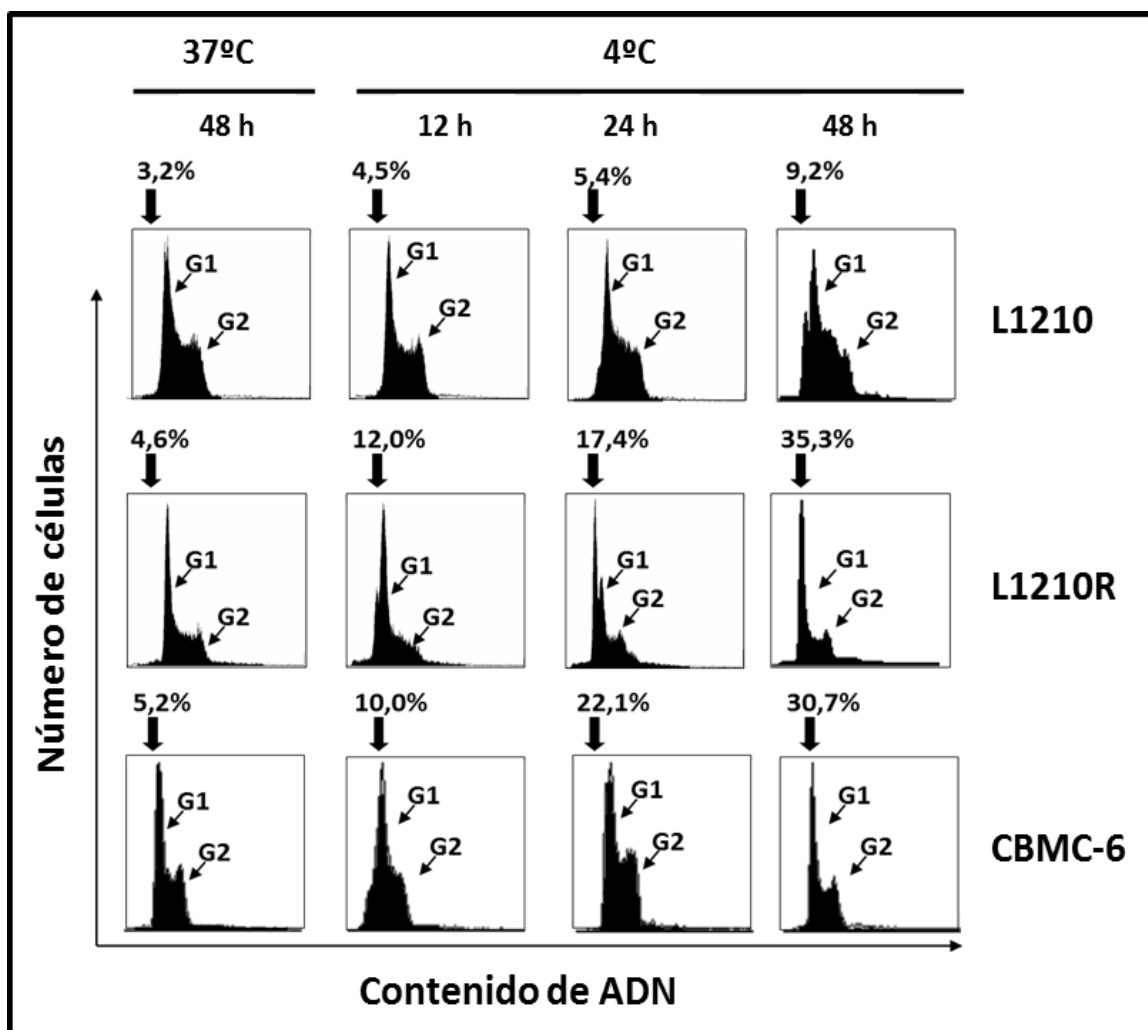


Figura 4.6. Análisis del ciclo celular en las líneas leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 durante el proceso de estrés hipotérmico. Representación gráfica del ciclo celular a distintos tiempos (12, 24 y 48 h) de exposición a estrés hipotérmico (cultivo a 4°C de temperatura). G1: células en fase G1 del ciclo celular, G2: células en fase G2 del ciclo celular. Las flechas señalan el porcentaje de células contenidas en el pico sub-G1, que representa niveles de apoptosis celular. Cerezo D. et al., 2012.

Estos datos indican que la progresión de células a través de la fase G1 del ciclo celular debe preceder a la apoptosis inducida por la exposición a bajas temperaturas de las células con fenotipo MDR y de las transfectadas con P-gp.

Adicionalmente, para confirmar que la apoptosis era el mecanismo de muerte celular inducido por frío en células leucémicas con fenotipo MDR, se realizaron varios ensayos de tinción con anexina V-FITC. Estos experimentos permitían cuantificar el proceso de apoptosis temprana, puesto que anexina V es una proteína que se une específicamente a fosfatidilserina cuando ésta se encuentra expuesta en la membrana celular, suceso que ocurre al inicio del proceso de apoptosis. En la **figura 4.7** se representa el resultado de esta tinción en las tres líneas celulares estudiadas tanto en un cultivo mantenido a una temperatura de 37°C como después de una exposición a estrés hipotérmico (4°C) durante 24 horas.

En la **figura 4.7A** se puede observar un gráfico representativo del análisis por citometría de una tinción doble de yoduro de propidio y anexina V antes y después de someter las células a estrés por frío. Estos gráficos se dividen en cuatro cuadrantes: Inferior izquierdo (*LL*) que comprende las células que no han entrado en proceso de apoptosis, Inferior derecho (*LR*) que comprende las células que están en un proceso de apoptosis temprana, Superior izquierdo (*UL*) y Superior derecho (*UR*) que comprenden las células en proceso de apoptosis tardía o de necrosis, habiendo pasado las células comprendidas en el cuadrante *UR* por un proceso de apoptosis temprana anteriormente. En esta figura se puede comprobar que en la línea celular L1210, tras 24 horas de incubación a 4°C, el 9% de la población se encuentra en el cuadrante *LR* y el 7,9% en el cuadrante *UR*; en la línea celular L1210R el 22% de la población se encuentra en el cuadrante *LR* y el 55,2% en el *UR*; y en la línea celular CBMC-6 el 12,2% de la población se encuentra en el cuadrante *LR* y el 55,2% en el *UR*. Mostrando así que la mayoría de la población en las líneas celulares L1210R y CBMC-6 sufre un proceso de apoptosis bajo estrés hipotérmico.

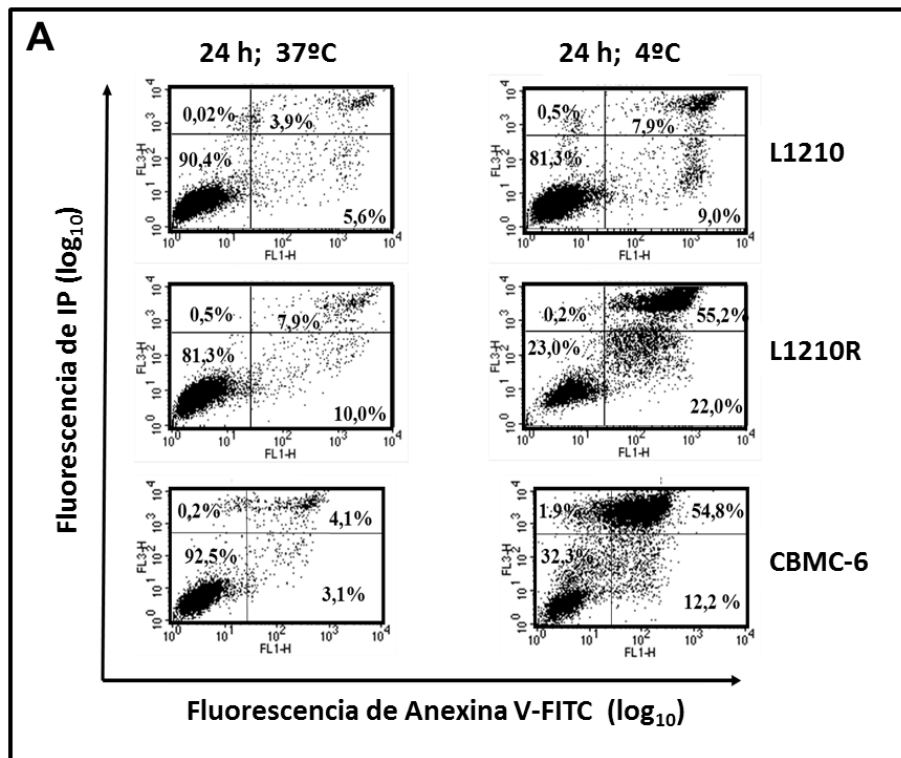


Figura 4.7A. Análisis de los niveles de apoptosis temprana y tardía en las tres líneas celulares leucémicas sometidas a estrés hipotérmico. Las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 fueron cultivadas a 37°C y 4°C durante 24 horas. Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) y los resultados se analizaron mediante citometría de flujo. **Cuadro inferior izquierdo (LL):** Células vivas. **Cuadro inferior derecho (LR):** células en proceso de apoptosis temprana. **Cuadro superior derecho (UR):** Células en proceso de apoptosis tardía y/o necrosis. En cada cuadro se muestra el porcentaje de la población comprendido en él. N=4.

La **figura 4.7B** muestra cómo aumentó la exposición de fosfatidilserina en la membrana celular de las células L1210R cultivadas en frío respecto a las células L1210 ($P < 0,01$), también se observó un aumento de la exposición de fosfatidilserina en las células CBMC-6, aunque dicho aumento fue menor que el observado en células L1210R.

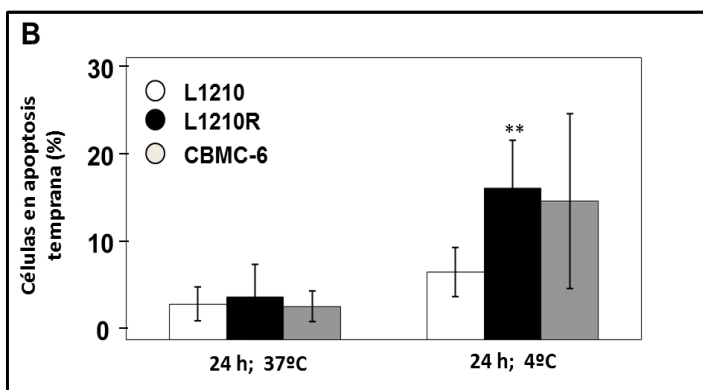


Figura.4.7B. Niveles de apoptosis temprana en las tres líneas celulares leucémicas (L1210, L1210R y CBMC-6) cultivadas en condiciones fisiológicas (37 °C) o de estrés hipotérmico (4 °C). Representación gráfica de células positivas para Anexina V pero no para yoduro de propidio, indicativos de un estadio temprano de apoptosis. Las barras de error indican \pm error típico de la media. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de ** $P < 0,01$. N=4. Cerezo D. et al., 2012.

3.2. Implicación de las caspasas en la muerte celular inducida por estrés hipotérmico.

Para determinar si la activación de la apoptosis por bajas temperaturas en las líneas celulares L1210R y CBMC-6 era un proceso dependiente o no de caspasas, se determinó la actividad caspasa 3. Para ello, se cuantificaron los niveles del fragmento activo de caspasa 3 en extractos celulares mediante western-blot y se midió esta actividad mediante un ensayo enzimático colorimétrico, también se realizaron estudios de inhibición de muerte celular en presencia de inhibidores de caspasas. Se eligió caspasa 3 porque es la proteína efectora que representa el punto de convergencia de las rutas de apoptosis dependientes de caspasas.

3.2.1. Determinación de la expresión de caspasa 3 activa mediante western-blot.

La proteína caspasa 3 se puede encontrar en forma de procaspasa 3 (inactiva y con un peso molecular de 25 kDa) o en forma de caspasa 3 (activa y con pesos moleculares de 17, 15 y 13 kDa). Para diferenciar la cantidad de enzima activa e inactiva que hay en cada caso, se ha realizado western-blot de extractos celulares de las tres líneas celulares estudiadas a distintos tiempos de incubación en frío, utilizando un anticuerpo específico que reconocía ambas formas (activa e inactiva). Diferenciando las dos formas según su tamaño molecular, se estableció la activación de caspasa 3 para cada caso.

En la **figura 4.8(A,B)** se puede observar un western-blot representativo y un gráfico, que representa la media de 3 ensayos, mostrando la evolución de la cantidad de caspasa 3 activa durante el tratamiento de estrés por frío en los tres tipos celulares estudiados; se observa como el nivel basal de caspasa 3 es elevado en las células que expresan P-gp (tanto L1210R como CBMC-6), mientras que prácticamente no se encuentra caspasa 3 activa en las células que no expresan P-gp (L1210). Las células CBMC-6 muestran unos niveles intermedios de caspasa 3 activa, comprendidos entre los obtenidos en las células L1210 y L1210R. Cuando se someten a estrés por frío, las células L1210R continúan mostrando un nivel elevado de caspasa 3 que prácticamente permanece constante durante el tiempo de incubación, las células CBMC-6 muestran un nivel intermedio que comienza a aumentar a partir de las 2 horas de exposición al frío y

las células L1210 muestran un gran aumento de la cantidad de caspasa 3 a partir de las 4 horas de exposición a estrés hipotérmico.

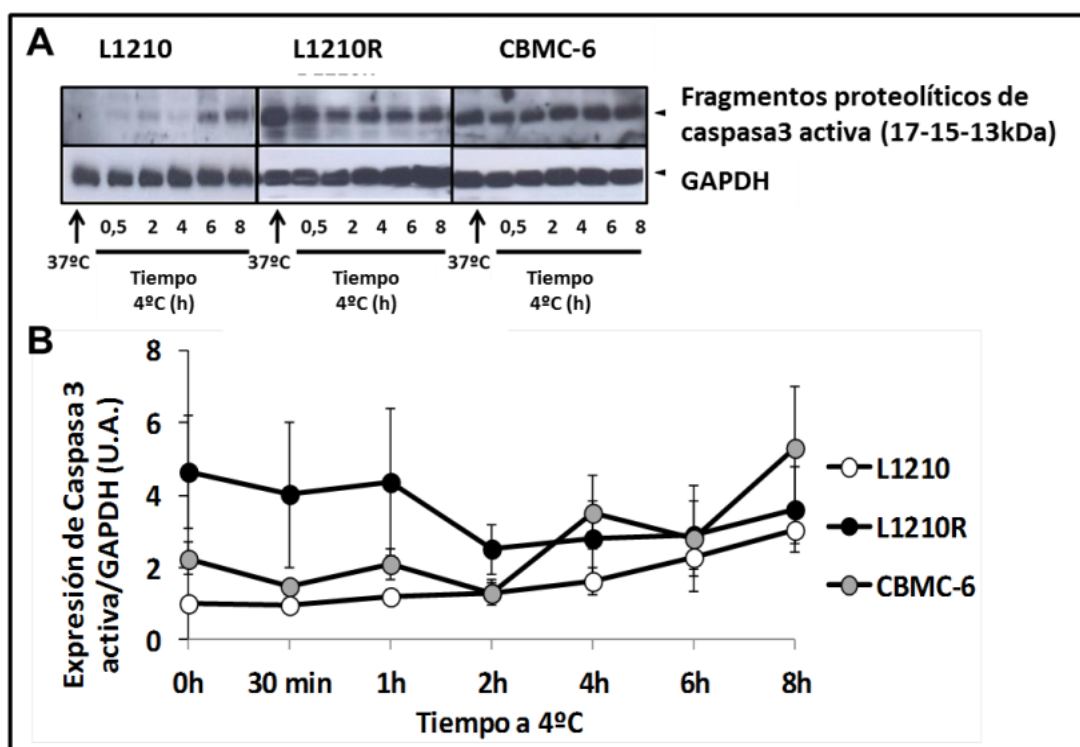


Figura 4.8. Niveles de caspasa 3 activa en líneas celulares leucémicas incubadas a temperatura fisiológica (37 °C) o en condiciones de estrés hipotérmico (4°C). A. Western-blot representativo de varios realizados en el que se muestra la cantidad del fragmento activo de caspasa 3 (17 kDa) en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 incubadas en condiciones de estrés hipotérmico (4 °C). Como control de carga se ha utilizado la proteína GAPDH. B. Representación gráfica de los niveles de caspasa 3 activa en células L1210, L1210R y CBMC-6, incubadas a distintos tiempos en condiciones de estrés hipotérmico (4°C). La gráfica representa los niveles del fragmento proteolítico (17 kDa) generado como consecuencia de la activación de pro-caspasa 3. Dicha determinación se realizó mediante la técnica de western-blot. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N=3. Cerezo D. et al., 2012.

3.2.2. Ensayo colorimétrico para determinar actividad enzimática de caspasa 3.

En la **figura 4.8C** se puede observar la evolución de la actividad enzimática de caspasa 3 en cada tipo celular, cuantificado mediante ensayo colorimétrico. Al igual que en el análisis mediante western-blot, se observa un alto nivel de actividad enzimática de caspasa 3 en las células con fenotipo MDR, siendo éste mayor en las células L1210R que en las células CBMC-6. Cuando todos los tipos celulares se someten a estrés por frío, las células L1210R siguen mostrando una alta actividad enzimática de caspasa 3, las células CBMC-6 muestran un ligero aumento de esta actividad a partir de 2 horas de

exposición al frío, y las células L1210 sólo muestran un aumento a partir de 6 horas de exposición a bajas temperaturas; concordando estos datos, en gran medida, con los resultados obtenidos mediante el análisis del fragmento proteolítico de caspasa 3 cuantificado mediante western-blot.

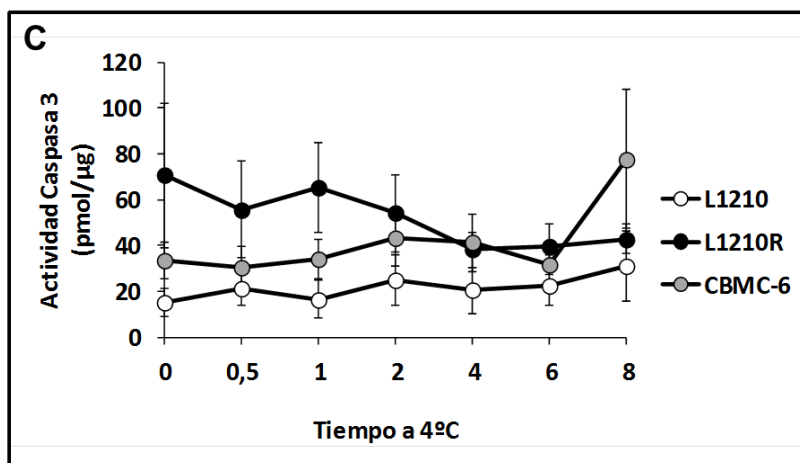


Figura 4.16. Efecto del silenciamiento de Pg-p en la viabilidad de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 tras ser cultivadas con dosis de DNM cercanas a la IC_{50} de cada tipo celular. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las

3.2.3. Utilización de inhibidores farmacológicos específicos de caspasas.

Para estudiar la contribución de las caspasas a la muerte celular por frío observada en las células leucémicas quimiorresistentes de ratón, se realizaron cultivos celulares sometidos a temperaturas de 4°C durante 24 horas y se añadieron inhibidores específicos de las caspasas 3, 8 y 9.

En primer lugar, se estudió la contribución a la muerte celular de caspasa 3, puesto que las rutas de apoptosis inducidas por caspasas convergen en esta proteína. En la **figura 4.9A** se muestra el efecto de la inhibición de caspasa 3 sobre la muerte celular en frío. Así, se observa cómo la inhibición de caspasa 3 no tiene efecto sobre la muerte celular de la línea parental L1210, mientras que disminuye de forma considerable la muerte celular tanto en las células L1210R (disminución del 50,85% de la muerte celular inducida por frío) como en las células CBMC-6 (disminución del 48,8% de la muerte celular inducida por frío).

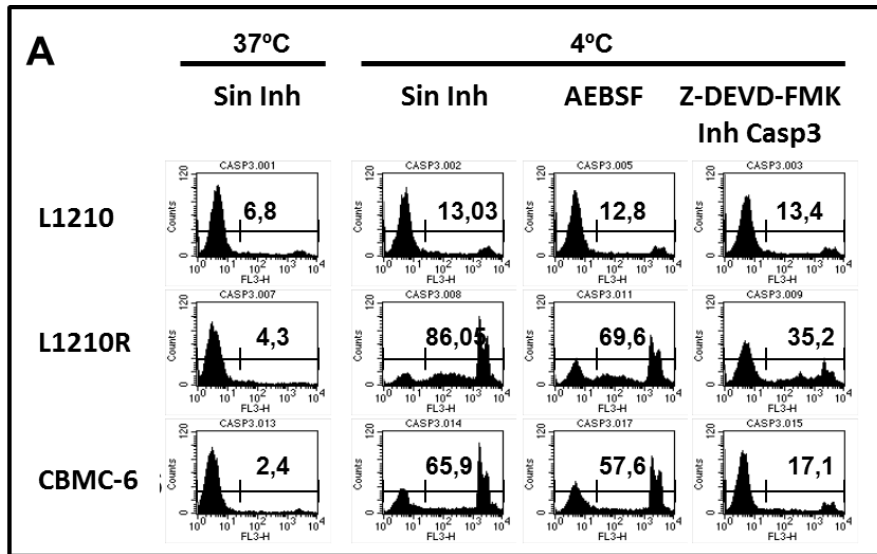


Figura 4.9. Efecto de la inhibición de la actividad Caspasa 3 sobre la muerte celular de las líneas leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas en condiciones de estrés hipotérmico. (A) Gráficos representativos de la muerte celular producida en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas durante 24 h a 37°C y 4°C en las siguientes condiciones: Sin Inh: Cultivo celular sin inhibidores de caspasa 3, AEBSF: Cultivo con AEBSF (inhibidor de serín proteasas), Z-DEVD-FMK Casp3 Inh: Cultivo con inhibidor farmacológico específico de Caspasa 3. Las células, cultivadas en las condiciones descritas, fueron teñidas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Los números representan los porcentajes de muerte celular en las distintas condiciones y líneas celulares especificados en la figura. Cerezo D. et al., 2012.

En segundo lugar, se estudió la contribución de caspasa 9 y caspasa 8 a este proceso de apoptosis, como caspasas representativas de las rutas intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis. En la **figura 4.9B** se observa el efecto de la inhibición de caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 en los tres tipos celulares estudiados sometidos a estrés por frío. En las células L1210 se observa que los inhibidores de las distintas caspasas no producen una disminución de la muerte celular, más bien producen un aumento de ésta, siendo la diferencia significativa en el caso del inhibidor de caspasa 3 ($P < 0,05$), esto puede ser debido a que estos inhibidores tienen cierto efecto citotóxico. En cambio, en las células L1210R se produce una gran disminución de la muerte celular al utilizar los tres inhibidores de caspasas ($P < 0,05$ para los inhibidores de caspasa 8 y caspasa 9, $P < 0,001$ para el inhibidor de caspasa 3); disminución que también se observa en las células CBMC-6 aunque en menor medida ($P < 0,05$ para los inhibidores de caspasa 8 y caspasa 9, $P < 0,01$ para el inhibidor de caspasa 3).

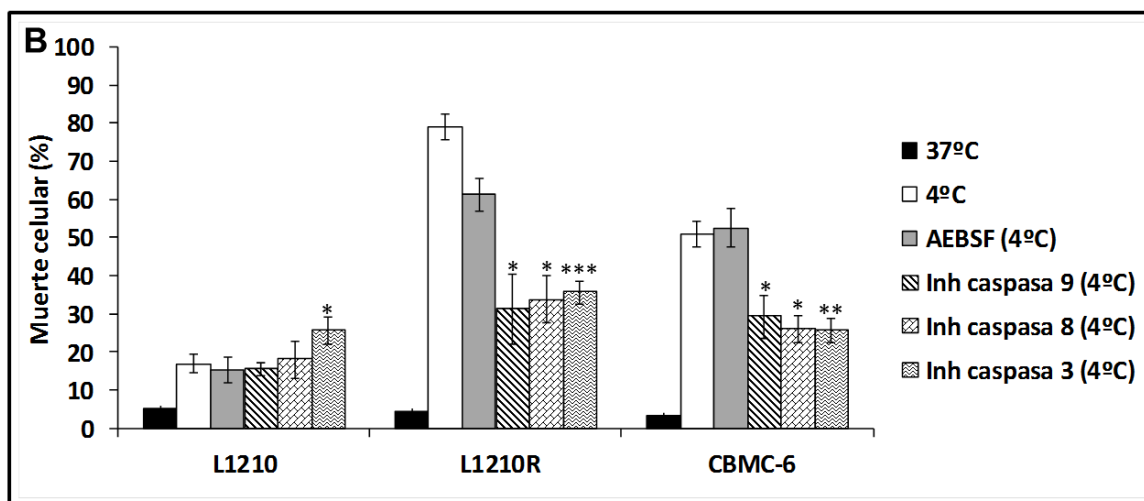


Figura 4.9B. Efecto de la inhibición de la actividad caspasa 3, caspasa 9 y caspasa 8 sobre la muerte celular de las líneas leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas en condiciones de estrés hipotérmico. Las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 fueron cultivadas a 37°C y 4°C en las siguientes condiciones: 37°C: Cultivo a 37°C sin inhibidores; 4°C: Cultivo a 4°C sin inhibidores; AEBSF: Cultivo a 4°C en presencia de AEBSF (inhibidor de serín proteasas), **Inh caspasa 3**: Cultivo a 4°C en presencia de un inhibidor específico de caspasa 3, **Inh caspasa 8**: Cultivo a 4°C en presencia de un inhibidor específico de Caspasa-8, **Inh Caspasa-9**: Cultivo a 4°C en presencia de un inhibidor específico de caspasa 9. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ respecto a los datos obtenidos para el control sin inhibidores (4°C). $N=6$ para 37°C, 4°C, AEBSF (4°C) e Inh caspasa 3 (4°C), $N=3$ para Inh caspasa 9 (4°C) e Inh caspasa 8 (4°C). Cerezo D. et al., 2012.

4. Papel de glicoproteína P en la sensibilidad colateral al frío en células murinas con fenotipo MDR.

Debido a que el proceso de sensibilidad colateral al frío iba asociado a la aparición del fenotipo MDR y, más concretamente a la expresión de P-gp en nuestro modelo de células leucémicas murinas, decidimos estudiar más detalladamente el papel que dicha glicoproteína desempeñaba en el proceso de muerte celular por estrés hipotérmico.

4.1. Expresión de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia.

Con objeto de comprobar el efecto de la incubación a 4°C en los niveles de expresión de glicoproteína P en células leucémicas de ratón, los cultivos celulares se sometieron a dicha temperatura durante distintos tiempos, desde 0 hasta 24 horas. Posteriormente se obtuvieron los extractos proteicos correspondientes a las distintas líneas celulares y tiempos de incubación en frío para su posterior análisis mediante la

técnica de western-blot (**figura 4.10**). Los resultados mostraron un aumento en los niveles de expresión de P-gp tanto en los extractos proteicos procedentes de células L1210R como en los correspondientes a las células CBMC-6. Mientras que en la línea celular L1210R el frío induce un aumento de expresión de P-gp de hasta 4 veces el nivel basal de dicha proteína (células cultivadas a 37°C); en el caso de la línea celular CBMC-6 el aumento llega hasta 20 veces sobre el nivel de expresión basal de proteína ($P<0,01$ para L1210R a 24 horas y $P<0,05$ para CBMC-6 a 12 horas).

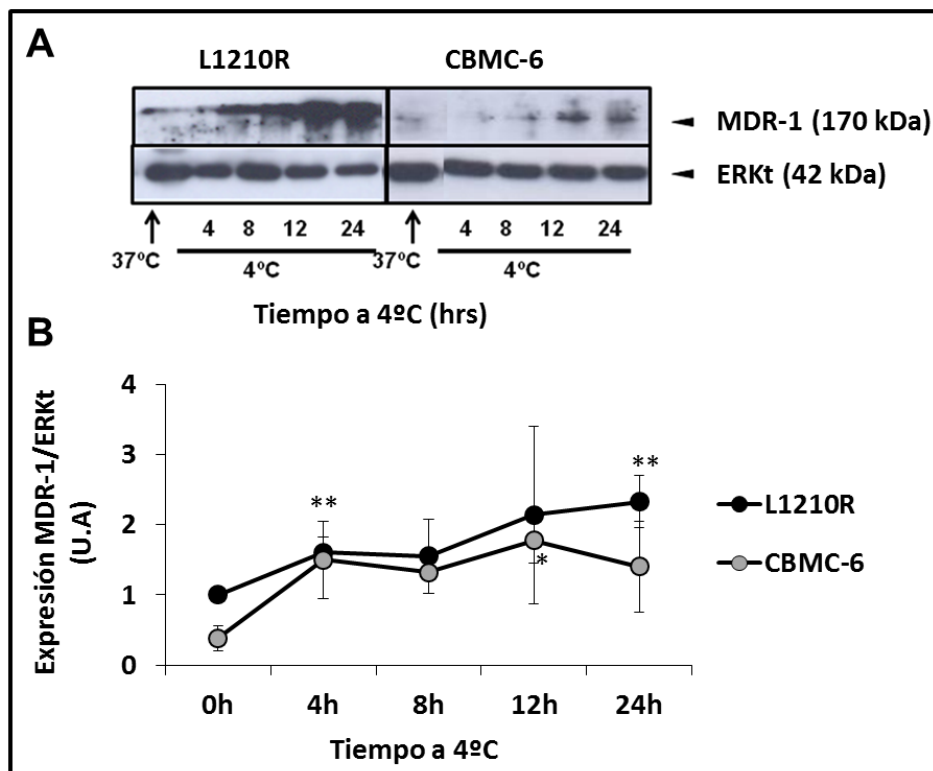


Figura 4.10. Expresión de MDR-1 en las dos líneas celulares leucémicas con fenotipo MDR (L1210R y CBMC-6) cultivadas en condiciones de estrés hipotérmico. **(A)** Western blot representativo de la evolución de los niveles de expresión de la proteína MDR-1 en las líneas celulares L1210R y CBMC-6 cultivadas en condiciones de estrés hipotérmico a diferentes tiempos (4, 8, 12 y 24 h). Como control de carga se utilizó la proteína ERKt. **(B)** Representación gráfica de la expresión de la proteína MDR-1 relativa al control de carga y expresada en unidades arbitrarias (A.U.) La normalización se realizó respecto al nivel de expresión de la muestra a tiempo 0h de la línea celular L1210R. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de $*P<0,05$ y $**P<0,01$. N=3.

4.2. Funcionalidad de P-gp en líneas celulares leucémicas sometidas a hipotermia. Acumulación de rhodamina 123.

Para determinar la funcionalidad de la bomba de extrusión de fármacos P-gp en estas líneas celulares incubadas a 37°C o a 4°C, se realizaron ensayos de acumulación de rhodamina 123. Este compuesto se acumula en el interior de la célula y es sustrato de la proteína P-gp, además emite fluorescencia que puede ser cuantificada mediante citometría de flujo; así, cuanto mayor sea la acumulación de este compuesto en el interior celular, menor es la funcionalidad de P-gp.

En estos ensayos se presenta la dificultad de que la solubilidad en el medio y la penetrancia en la célula de rhodamina 123 se ve alterada por la temperatura (Kleinow KM et al., 2006) debido a que la fluidez de la membrana celular disminuye al decrecer la temperatura, siendo la medida más apropiada para la acumulación de estas sustancias el índice de acumulación relativa, que se calcula relativizando la acumulación en una línea celular que expresa P-gp a la acumulación en la línea celular que no expresa ninguna bomba de extrusión de fármacos. En nuestro caso utilizamos la siguiente fórmula:

$$Acumulación\ relativa = \left(\frac{Acumulación\ células\ con\ P-gp}{Acumulación\ L1210} \right) \times 100$$

En la **figura 4.11A** se representa la evolución de la acumulación de rhodamina 123 en los tres tipos celulares estudiados cuando se exponen al estrés por frío a distintos tiempos (de 0 a 8 horas). En esta figura se observa que a tiempo 0 horas (incubación a temperatura de 37°C) la acumulación de este compuesto es aproximadamente 6 veces mayor en las células sensibles que en las resistentes. En condiciones de hipotermia, las células L1210 experimentan una disminución de la acumulación debida a la menor penetrancia de rhodamina 123 en las células a baja temperatura, mientras que en las células resistentes L1210R y CBMC-6 la acumulación de rhodamina 123 se mantiene constante.

En la **figura 4.11B** se muestra la acumulación relativa de rhodamina 123 de los tipos celulares L1210R y CBMC-6, mostrando ambos un incremento continuo conforme aumenta el tiempo de exposición al frío, alcanzando el máximo de acumulación a las 8 horas de cultivo a 4°C. Ambos tipos celulares muestran un pequeño pico de acumulación a tiempo 1 h.

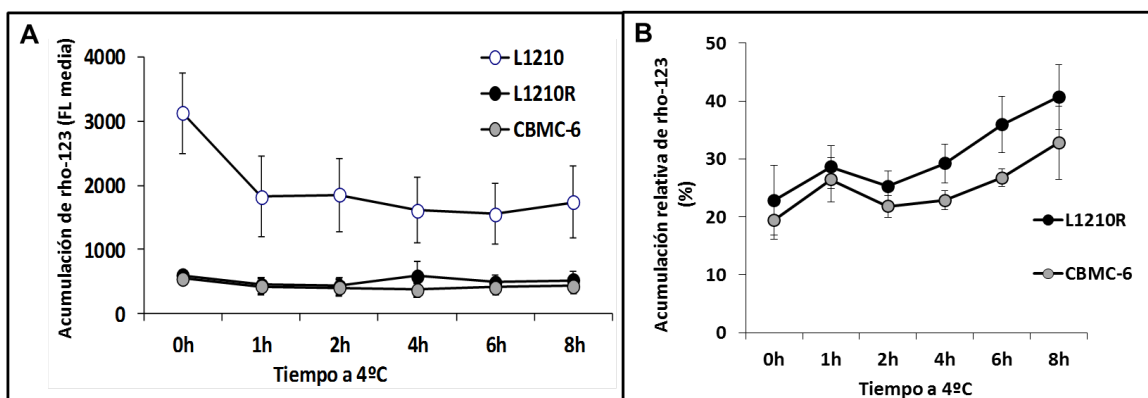


Figura. 4.11. Acumulación de rhodamina 123 en líneas celulares leucémicas sometidas a estrés hipotérmico. A. Representación gráfica de la acumulación de rhodamina 123 (rho) en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 a distintos tiempos de cultivo a 4°C. **B.** Representación gráfica de la acumulación relativa de rhodamina 123 en las líneas celulares L1210R y CBMC-6 bajo condiciones de estrés hipotérmico. Las barras de error representan \pm error típico de la media y N=5 para A y B.

Con el propósito de confirmar los datos obtenidos con el ensayo anterior, se realizaron experimentos en los que las tres líneas celulares fueron incubadas con rhodamina 123 durante 1 hora a 37°C, para permitir que dicha molécula se acumulara en el interior de las células en mayor o menor medida, dependiendo de la funcionalidad de P-gp. Posteriormente, dichas células se incubaron a 37°C o a 4°C durante un período de tiempo de 8 horas y, finalmente, se determinó la acumulación de rhodamina 123 en las tres líneas celulares mediante citometría de flujo. Como controles se utilizaron células incubadas en presencia del inhibidor competitivo de P-gp, verapamilo (VRP). En la **figura 4.11C** se muestran las gráficas de acumulación de rhodamina 123 para cada tipo celular a 4°C o a 37°C y en presencia o no de verapamilo.

En las células L1210 se puede comprobar que, a 37°C, se produce la acumulación máxima de rhodamina 123, puesto que dichas células no poseen P-gp ni ninguna otra proteína que funcione como bomba extrusora de fármacos. En consonancia con este hecho, no se encontró ninguna diferencia en los niveles de acumulación de rhodamina en las células tratadas con el inhibidor verapamilo con respecto a las no tratadas. De la misma forma, al realizar el análisis de las mismas células incubadas a

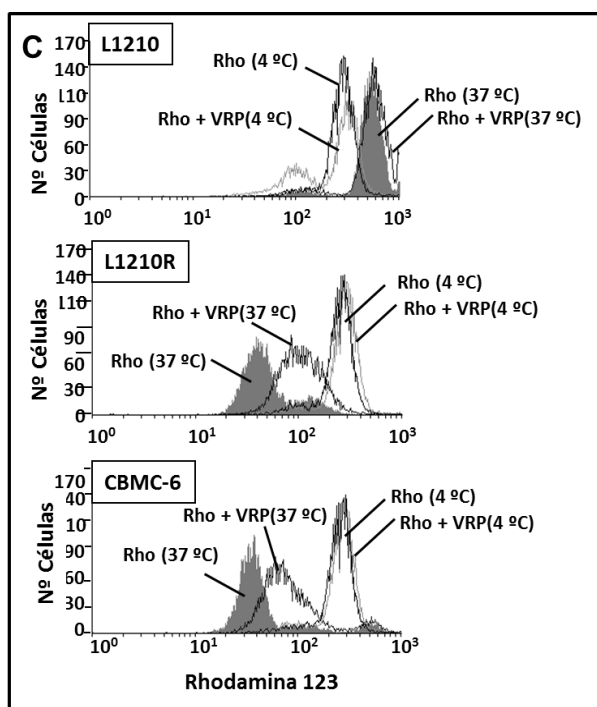


Figura 4.11 C. Gráfico representativo de la acumulación de rhodamina 123(Rho) en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 en las siguientes condiciones: **Rho(37°C)**, tinción con Rho en cultivo a 37°C; **Rho(4°C)**, tinción con Rho en cultivo a 4°C; **Rho + VRP (37°C)**, tinción con Rho en cultivo a 37°C y en presencia del inhibidor de MDR-1, verapamilo; **Rho + VRP (4°C)**, tinción con Rho en cultivo a 4°C y en presencia del inhibidor verapamilo.

4°C, se observa una menor acumulación de rhodamina, resultado de la menor penetrancia en las células de este compuesto a bajas temperaturas, y no se observó ninguna diferencia en la acumulación de rhodamina entre células tratadas con verapamilo y las mismas células sin tratar. En cambio, en las líneas celulares L1210R y CBMC-6, la acumulación mínima de rhodamina se obtuvo a 37°C, observándose un aumento de esta acumulación cuando se añadió el inhibidor de P-gp verapamilo, indicativo de una inhibición parcial de la actividad de la bomba extrusora de fármacos; sin embargo, los mayores niveles de acumulación de rhodamina 123 se

produjeron con la incubación a 4°C, no observándose, a esta temperatura, ninguna diferencia en la acumulación de rhodamina entre células tratadas con verapamilo y las células no tratadas. Estos resultados confirman que a 4°C se inactiva la función extrusora de fármacos de glicoproteína P a pesar de que aumenta su expresión (**figura 4.10**).

4.3. Efecto del silenciamiento de P-gp con oligonucleótidos de ARN sobre viabilidad celular y resistencia a múltiples fármacos.

Con el objetivo de comprobar la implicación de glicoproteína P en los procesos de sensibilidad colateral al frío y activación de caspasa 3, se realizaron ensayos de silenciamiento de la expresión de P-gp mediante la técnica de nucleofección, utilizando oligonucleótidos silenciadores de P-gp 1a (Abcb1a) y de P-gp 1b (Abcb1b).

El primer paso realizado fue la puesta a punto de la técnica. El éxito del silenciamiento se midió obteniendo extractos celulares de todos los tratamientos realizados y comprobando mediante western-blot la expresión de glicoproteína P. Los silenciamientos de P-gp (Abcb1a, Abcb1b y Abcb1a+1b) se compararon con el silenciamiento obtenido al utilizar un oligonucleótido de ARN que no silencia ninguna proteína conocida (siARN control negativo). Se incluyeron como controles células sometidas al proceso de nucleofección sin añadir oligonucleótido (Mock) y células sin ningún tipo de tratamiento (Sin tratamiento) para comprobar el efecto de la técnica utilizada sobre la viabilidad celular. En la **tabla 4.II** se muestra la media de éxito obtenido con los silenciamientos de P-gp, observándose un silenciamiento de entre el 30 y el 42% en las células L1210R, siendo mayor el silenciamiento producido al silenciar

Especificidad de siRNAs	Líneas celulares	
	L1210R	CBMC-6
Abcb1a	29,5±7,6 %	36,0±3,5%
Abcb1b	42,7±17,6 %	0,2±5,0 %
Abcb1a+1b	39,6±24,5 %	8,9±14,7%

Tabla 4.II. Silenciamiento obtenido con los oligonucleótidos de ARN (siARNs) específicos de Abcb1a y Abcb1b en las líneas celulares L1210R y CBMC-6. La tabla representa el porcentaje medio de silenciamiento obtenido para la proteína P-gp \pm el error típico de la media, en las líneas celulares L1210R y CBMC-6. Se consideró el porcentaje de silenciamiento como la disminución de la expresión de dicha proteína observada mediante western-blot respecto de la expresión de la proteína observada al utilizar un siRNA Control negativo N= 7 para los silenciamientos de Abcb1a y n=5 para los silenciamientos Abcb1b y Abcb1a+1b.

P-gp1b que al silenciar P-gp1a; en las células CBMC-6 se consiguió un silenciamiento del 36% para P-gp1a, mientras que, como era de esperar, no se obtuvo ningún éxito al intentar silenciar P-gp1b puesto que dicha proteína no está presente en estas células; en la línea celular L1210 se realizaron también ensayos de silenciamiento de P-gp, aunque no se obtuvo ningún resultado debido a que estas células no expresan dicha proteína (datos no mostrados).

4.3.1. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la supervivencia celular y los niveles de caspasa 3.

En la **figura 4.12** se muestra la influencia del silenciamiento de P-gp sobre la viabilidad celular a 37°C, pudiendo comprobarse que en las células L1210 el silenciamiento de esta proteína no tiene ningún efecto; en las células L1210R la técnica de nucleofección provocó un aumento de la muerte celular basal y aunque se observó una disminución de la muerte celular al silenciar P-gp1a y P-gp1b, dicha disminución no fue significativa; en las células CBMC-6 tampoco se observaron cambios significativos en la viabilidad celular tras el silenciamiento de P-gp1a y/o P-gp1b.

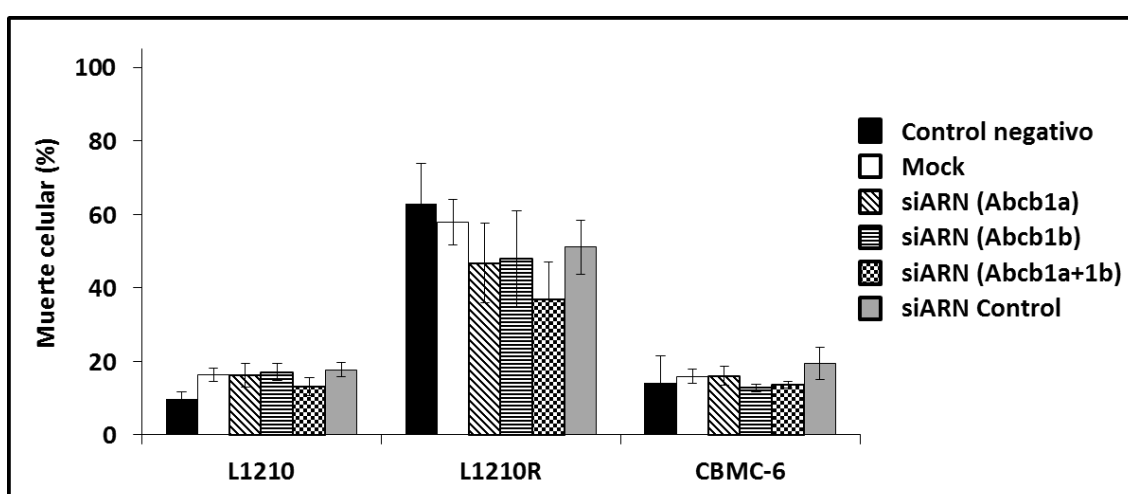


Figura 4.12 .Muerte celular obtenida al silenciar P-gp en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas a 37°C. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs) y cultivadas durante 48 h a 37°C. El porcentaje de muerte celular fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Los oligonucleótidos silenciadores utilizados fueron los siguientes: siARN Abcb1a, siARN Abcb1b, y un silenciador inespecífico (no silencia ningún ARNm conocido) indicado como siARN Control. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 5.

En la **figura 4.13** se muestra el efecto del silenciamiento de P-gp sobre la viabilidad celular en condiciones de estrés hipotérmico (4°C). En las células L1210 no se observa efecto alguno debido a que dichas células no expresan esta proteína, en las células L1210R se aprecia un ligero aumento de la muerte celular con todos los silenciamientos de P-gp aunque dicho aumento no fue significativo en ningún caso; y en las células CBMC-6 tampoco se aprecian diferencias significativas de la viabilidad celular tras el silenciamiento de P-gp. La ausencia de diferencias estadísticamente significativas, probablemente sea debido a la baja tasa de silenciamiento de P-gp obtenido con estas condiciones y, en el caso de las células L1210R debido además a la

alta proporción de muerte celular basal obtenida como consecuencia del proceso de electroporación (nucleofección) y a la debida a las condiciones de estrés hipotérmico.

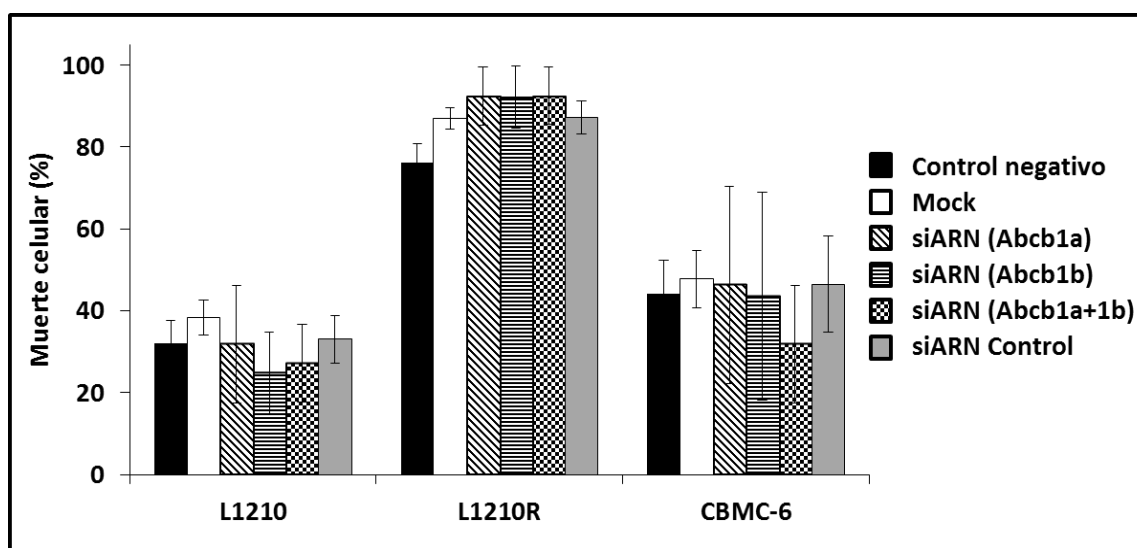


Figura 4.13 .Muerte celular obtenida al silenciar P-gp en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas a 4°C. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siRNAs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las células y, seguidamente, cultivadas a 4°C durante 24h. El porcentaje de muerte celular fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siRNA. Los oligonucleótidos silenciadores utilizados fueron los siguientes: siRNA Abcb1a, siRNA Abcb1b, y un silenciador inespecífico (no silencia ningún ARNm conocido) indicado como siARN Control. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 5.

Con el objetivo de estudiar la influencia de P-gp sobre la actividad caspasa 3, se midió, mediante western-blot, la cantidad de fragmento activo de esta enzima presente en los extractos celulares después del silenciamiento de P-gp.

En la **figura 4.14** se representa la media de la actividad caspasa 3 de todos los experimentos realizados, y un western-blot representativo del resultado. En las células L1210 no se observan grandes diferencias en la expresión del fragmento activo de caspasa 3 con ningún silenciamiento. En la línea celular L1210R se observa una disminución de la actividad caspasa 3 al silenciar la proteína P-gp1b y no se observa ningún aumento al silenciar P-gp1a. Finalmente en las células CBMC-6 se observa una disminución del fragmento activo de caspasa 3 al silenciar la proteína P-gp1a y no al silenciar P-gp1b, lo cual es concordante con el hecho de que estas células sólo expresan P-gp1a y no expresan P-gp1b. En ninguno de los casos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

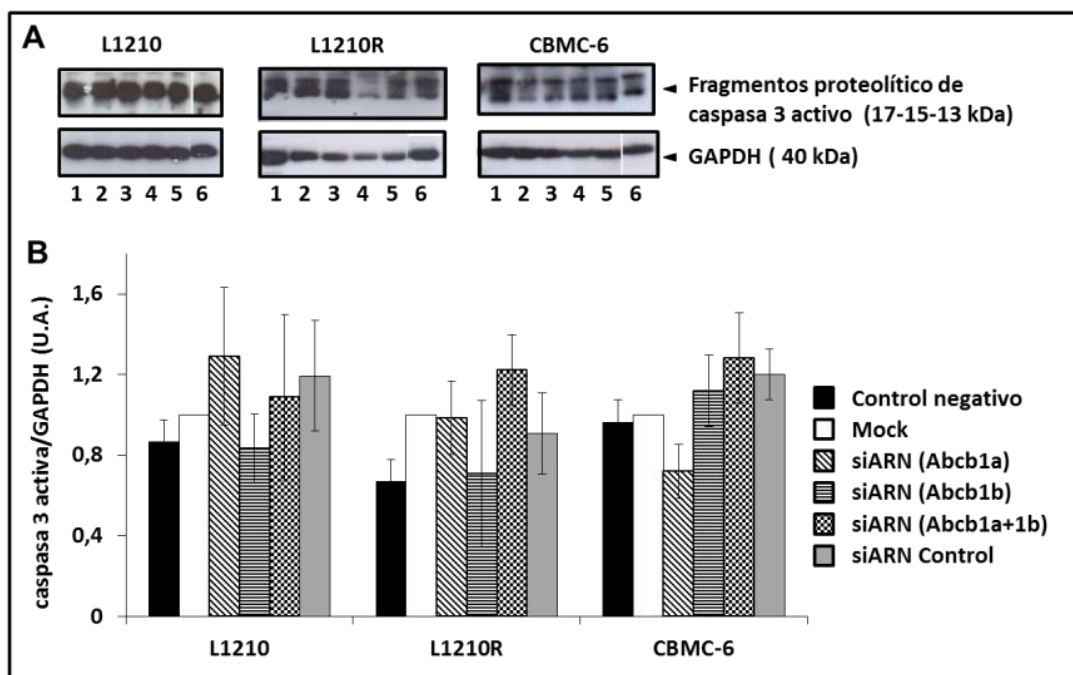


Figura 4.14 .Efecto del silenciamiento de P-gp sobre los niveles de caspasa 3 activa en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6. (A)Western-blots representativos de la expresión de caspasa 3 activa después del silenciamiento de la proteína Pg-p en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6. Las bandas correspondientes a cada tipo celular proceden de la misma membrana y el mismo revelado. **(B)**Representación gráfica de los niveles de expresión de caspasa 3 activa utilizando distintos silenciadores de ARNm (siARN específico de Abcb1a, siARN específico de Abcb1b y siARN control) en los tipos celulares L1210, L1210R y CBMC-6. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. La normalización de los densitometrados va referida al nivel obtenido para la muestra Mock de cada tipo celular. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 7 para los tratamientos Mock, siRNA (Abcb1a) y siRNA Control; N=4 para tratamientos siRNA (Abcb1b) y siRNA (Abcb1a+1b)

4.3.2. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la resistencia a fármacos.

Otro parámetro que se estudió tras el silenciamiento de P-gp fue la resistencia al estrés producido por un tratamiento con el fármaco DNM. Para ello, tras el silenciamiento, los cultivos celulares se incubaron en presencia de dos dosis distintas de DNM (0,45 μ M y 1,0 μ M) y se midió la muerte celular mediante tinción con IP y posterior análisis por citometría de flujo.

En la **figura 4.15** se puede observar los datos de viabilidad obtenidos tras la incubación con DNM de cultivos celulares tratados con oligonucleótidos específicos de P-gp1a. No se obtuvieron diferencias significativas en la viabilidad celular de los tres tipos celulares, aunque a una dosis de DNM de 1,0 μ M se aprecia una tendencia a incrementarse la muerte celular en las líneas L1210R y CBMC-6 cuando se silencia P-gp1a.

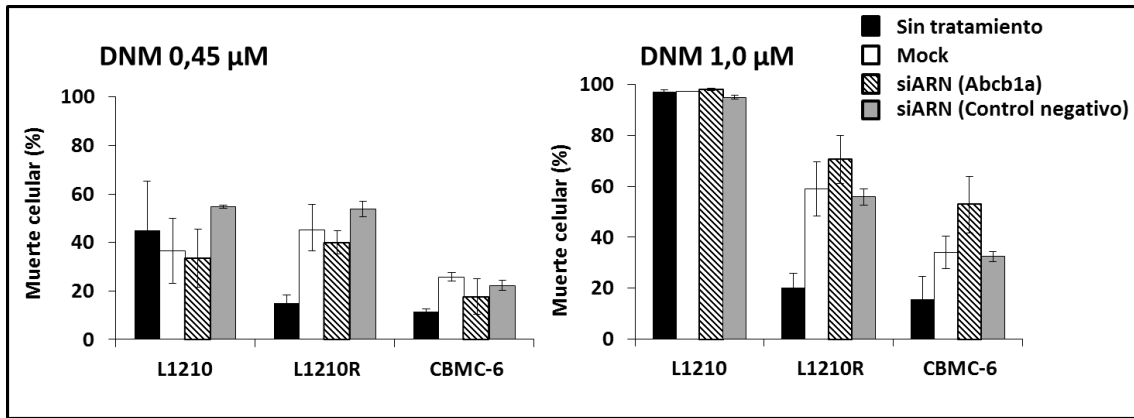


Figura 4.15 Efecto del silenciamiento de P-gp 1a (Abcb1a) en la viabilidad de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 tratadas con DNM. Representación gráfica del porcentaje de muerte celular tras tratamiento con dosis de DNM de 0.45 μM y 1.0 μM. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, cultivadas en presencia de DNM. El porcentaje de muerte celular se determinó mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 5.

Similares resultados se obtuvieron al tratar los cultivos celulares con dosis de daunomicina próximas a la IC_{50} de cada tipo celular durante 24 horas. En este caso la muerte celular se determinó mediante la técnica de MTT (**figura 4.16**).

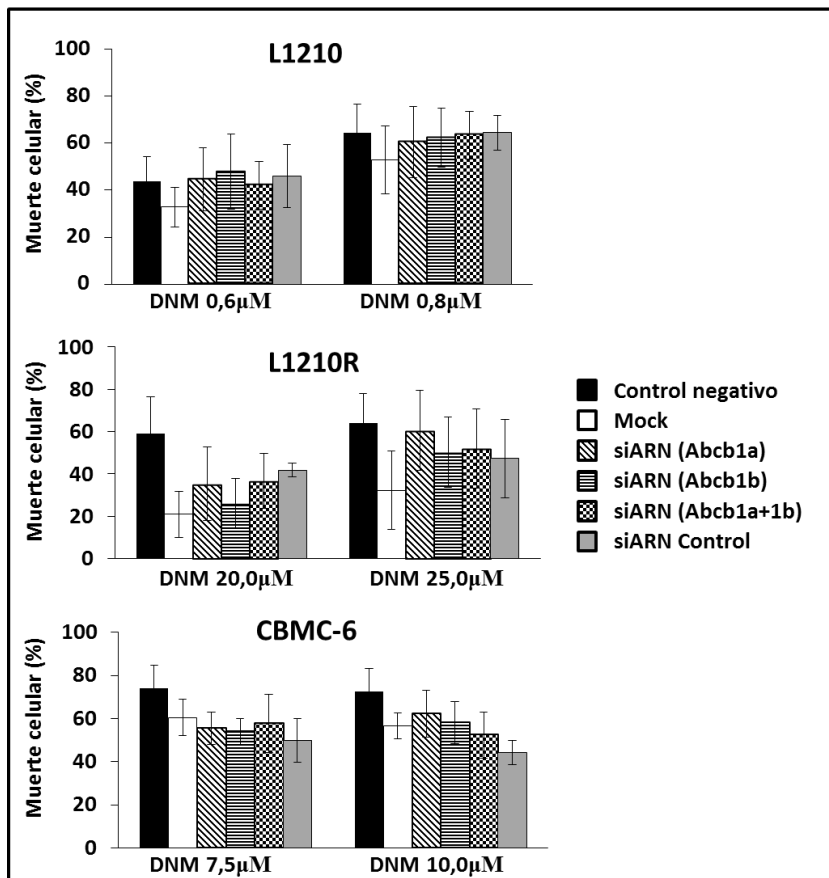


Figura 4.16 Efecto del silenciamiento de P-gp en la viabilidad de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 tras ser cultivadas con dosis de DNM cercanas a la IC_{50} de cada tipo celular. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, tratadas con DNM. El porcentaje de muerte celular se determinó mediante la técnica de MTT. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 5.

5. Contribución de las proteínas de la familia Bcl-2 a la supervivencia de las líneas celulares leucémicas sensibles y resistentes a fármacos.

Para comprobar la contribución de las proteínas de la familia Bcl-2 al fenotipo MDR en nuestro modelo murino y su implicación en el proceso de sensibilidad colateral, estudiamos la expresión de algunas proteínas de esta familia en las líneas celulares murinas así como su implicación en los procesos de sensibilidad colateral y resistencia a fármacos antineoplásicos. Parte de los resultados de los apartados 5.1 y 5.2 se incluyeron en la tesis de licenciatura titulada “ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MIEMBROS DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS BCL-2 EN LÍNEAS CELULARES LEUCÉMICAS MURINAS. CONTRIBUCIÓN A LA SUPERVIVENCIA CELULAR” de D^a Miriam Lencina Guardiola (2011). En las gráficas presentadas (**figuras 4.17 y 4.18**) se incluye un mayor número de experimentos a los presentados en dicha tesina, que, en el caso de la **figura 4.18**, han permitido obtener resultados con una alta significación estadística.

5.1 Niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en líneas celulares leucémicas de ratón sensibles y resistentes a fármacos.

Para estudiar la posible contribución de algunas de las proteínas de la familia Bcl-2 a la viabilidad celular y resistencia a múltiples fármacos de las líneas celulares L1210R y CBMC-6, se realizó western-blot de extractos de las líneas celulares resistentes a fármacos y de la línea parental, todas ellas cultivadas a una temperatura de 37°C. Se analizaron los niveles de expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y Bcl-2 y de la proteína pro-apoptótica Bax.

Respecto a los niveles de expresión de las proteínas anti-apoptóticas (**figura 4.17**) y, tomando como referencia la expresión de dicha proteína en la línea celular L1210, se observó que la expresión de Bcl-xL en la línea celular L1210R disminuía hasta un valor cercano al 20% ($P < 0,01$) respecto a la expresión de dicha proteína en la línea parental; en la línea celular CBMC-6 la expresión de dicha proteína permanecía prácticamente igual a la de la línea celular L1210. Al estudiar la expresión de la proteína Bcl-2, se observó que los niveles de expresión de dicha proteína en la línea celular L1210R eran muy elevados, siendo dicha expresión aproximadamente 20 veces mayor en células L1210R que en las líneas celulares L1210 y CBMC-6 ($P < 0,01$), ambas con niveles de expresión similares de dicha proteína. En cuanto a la proteína anti-apoptótica

Bax (figura 4.17), se observó que la expresión de esta proteína en la línea celular L1210R era similar a la de las líneas celulares L1210 y CBMC-6.

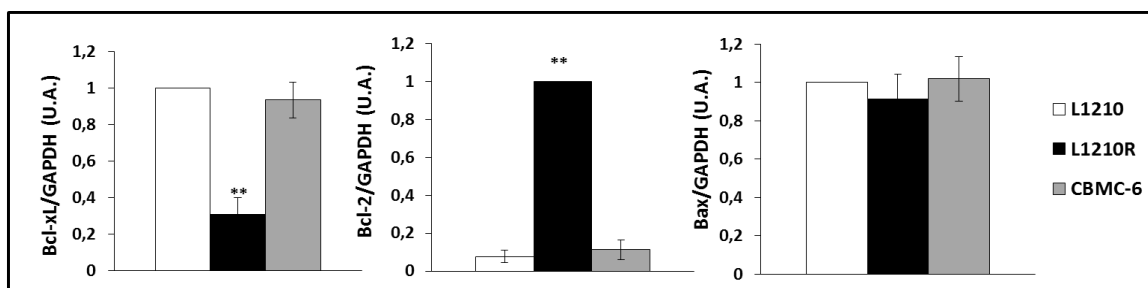


Figura 4.17 .Expresión basal de proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y Bcl-2 y de la proteína pro-apoptótica Bax en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6. Los valores de expresión de las proteínas están calculados respecto al control de carga (GAPDH) y representados en unidades arbitrarias (A.U.), las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas de $**P<0,01$. N= 10. Estos resultados se basan en los previamente publicados (Tesina de licenciatura de Doña Miriam Lencina Guardiola) aunque se han completado con nuevos experimentos.

5.2 Contribución de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 a la supervivencia celular en condiciones fisiológicas y de estrés.

La contribución de la familia de proteínas Bcl-2 a la muerte celular se estudió mediante el silenciamiento de ARNm específico de las proteínas Bcl-xL, Bcl-2 y Bax. El primer paso fue analizar la expresión de estas tres proteínas realizando western-blot de los extractos celulares obtenidos después del silenciamiento de las mismas. En la **tabla 4.III** se puede observar el porcentaje de silenciamiento obtenido en cada tipo

Especificidad de siRNAs	Líneas celulares		
	L1210	L1210R	CBMC-6
Bcl-xL	57,3 \pm 8,3 %	53,4 \pm 9,4 %	45,7 \pm 14,5%
Bcl-2	52,0 \pm 27,5 %	57,0 \pm 13,7 %	61,3 \pm 9,4 %
Bax	55,1 \pm 9,5 %	78,3 \pm 11,8 %	54,1 \pm 20,1%

Tabla 4. III. Porcentajes de silenciamiento obtenidos en las líneas celulares leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 tras electroporación con los oligonucleótidos de ARN específicos de las proteínas Bcl-xL, Bcl-2 y Bax. La tabla representa el porcentaje medio de silenciamiento obtenido \pm el error típico de la media. Se consideró el porcentaje de silenciamiento como la disminución de la expresión de dicha proteína observada mediante western-blot respecto de la expresión de la proteína observada al utilizar un siRNA Control negativo. N=10.

celular para cada una de las proteínas de la familia Bcl-2 estudiadas. Respecto a la expresión de la proteína Bcl-xL se obtuvo un silenciamiento medio del 50% en las tres líneas celulares estudiadas. El silenciamiento de la proteína Bcl-2 fue superior al 50% en las tres líneas celulares estudiadas. En cuanto al silenciamiento obtenido para

la proteína anti-apoptótica Bax, los porcentajes fueron de aproximadamente un 55% en las líneas celulares L1210 y CBMC-6, y de un 78% en la línea celular L1210R.

Después de realizar los silenciamientos de proteínas de la familia Bcl-2, se realizaron ensayos para estudiar la influencia de estas proteínas en la supervivencia celular. Para ello, se analizó la muerte celular que se producía en dichos cultivos a una temperatura de 37°C (figura 4.18A).

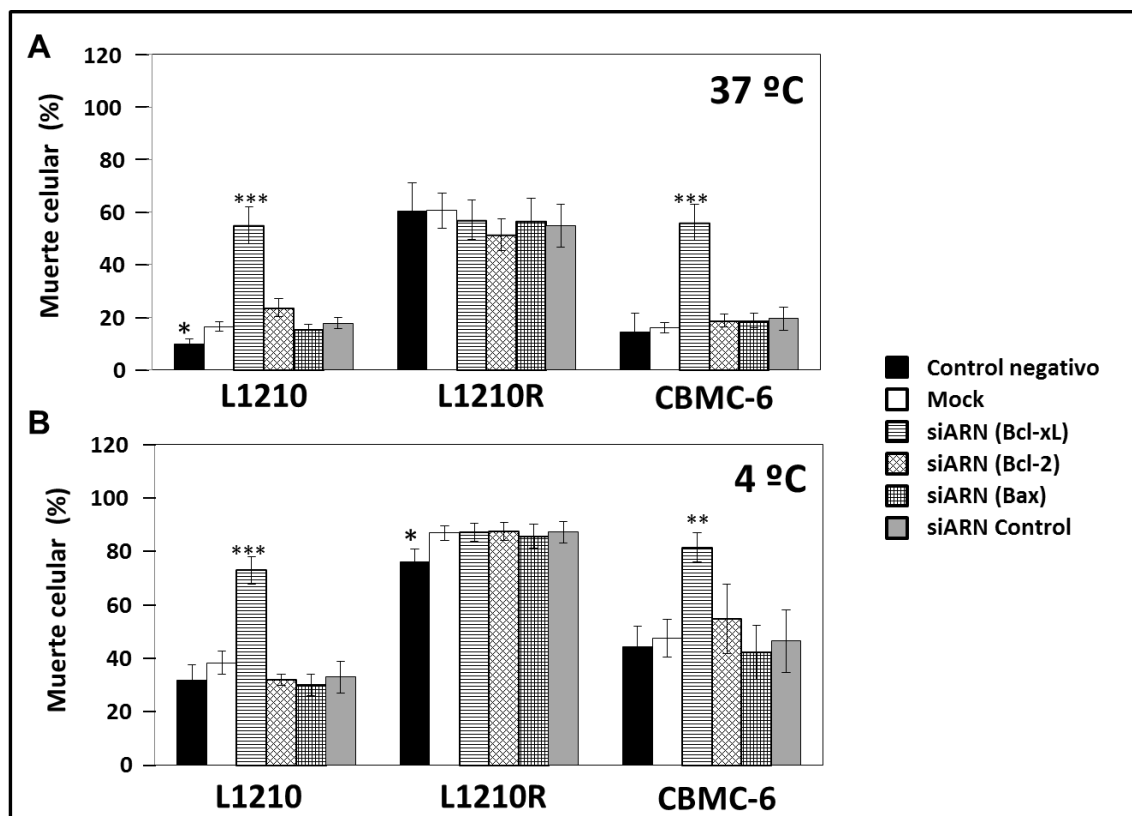


Figura 4.18 .Efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 en la viabilidad de las líneas celulares leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas en condiciones fisiológicas (37°C) y de estrés por frío (4°C). Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siRNAs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, cultivadas a 37°C (A) o a 4°C (B) durante 24h. Los porcentajes de muerte celular fueron determinados mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$. $N=10$. Estos resultados se basan en los previamente publicados (Tesina de licenciatura de Doña Miriam Lencina Guardiola) aunque se han completado con nuevos experimentos que han mejorado la significación estadística.

Se comprobó que en las líneas celulares L1210 y CBMC-6 el silenciamiento de la proteína Bcl-xL produjo un aumento significativo de la muerte celular ($P < 0,001$ para ambos casos), mientras que en la línea celular L1210R el silenciamiento de esta proteína no tuvo ningún efecto. El silenciamiento de la proteína Bcl-2 no tuvo efecto

significativo para ninguno de los tres tipos celulares estudiados. En cuanto al silenciamiento de Bax, tampoco produjo ningún efecto sobre la supervivencia celular en ninguna de las tres líneas celulares estudiadas.

Para estudiar el papel que desempeñan las proteínas Bcl-xL, Bcl-2 y Bax en la respuesta a estrés hipotérmico, después del silenciamiento de estas proteínas, las líneas celulares se incubaron a una temperatura de 4°C durante un periodo de 24 horas y se midió la muerte celular en cada caso mediante tinción con IP y posterior análisis mediante citometría de flujo.

En la **figura 4.18B** se observa el resultado de estos experimentos, donde se muestra que en la línea celular L1210 el silenciamiento de Bcl-xL produjo un aumento de la muerte celular ($P < 0,001$) que coincidía, aproximadamente, con el incremento de muerte celular a 37°C; en esta misma línea celular, el silenciamiento de las proteínas Bcl-2 y Bax no produjo ningún efecto sobre la muerte celular bajo estrés hipotérmico. En la línea celular L1210R, no se produjo ningún efecto con los silenciamientos de estas proteínas, aunque sí se observó que la técnica de nucleofección provoca un estrés en esta línea celular que aumenta su muerte en condiciones de estrés hipotérmico ($P < 0,05$). En la línea celular CBMC-6 se produjo un aumento significativo de la muerte celular al silenciar la proteína Bcl-xL ($P < 0,01$), y no se encontró efecto alguno al silenciar las proteínas Bcl-2 o Bax.

Para comprobar el efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 en la viabilidad celular en condiciones de estrés por tratamiento farmacológico, se realizaron dos tipos de ensayo: uno de ellos consistía en el tratamiento con DNM a tiempos cortos en el que se medía la muerte celular mediante tinción con IP y análisis por citometría de flujo, y otro consistía en la utilización de la técnica de MTT usando dosis de DNM cercanas a la IC_{50} de cada tipo celular. Por último, se comprobó si el silenciamiento de estas proteínas afectaba a la expresión de la bomba de extrusión de fármacos (western-blot) o a su funcionalidad (tinción con rodamina).

En la **figura 4.18C-D** se puede observar la influencia de los silenciamientos de proteína sobre la viabilidad celular en condiciones de estrés por tratamiento farmacológico, utilizando dos dosis distintas de DNM (0,4 μ M y 1,0 μ M) y analizando los resultados mediante citometría de flujo. En las células L1210 se observa un aumento

de la muerte celular al silenciar Bcl-xL, Bcl-2 y Bax, con la dosis de 0,4 μM de daunomicina, aunque dicho aumento no es significativo en ninguno de los casos citados; con la dosis 1,0 μM de daunomicina no se observan diferencias debido a que esta dosis provoca la muerte de la mayor parte de la población celular. En la línea celular L1210R no se observan variaciones significativas de la muerte celular con la dosis de 0,4 μM y de 1,0 μM de DNM en ninguno de los silenciamientos realizados. Por último, en la línea celular CBMC-6 se observa un gran aumento de la muerte celular con la dosis 0,4 μM de daunomicina cuando se silencia Bcl-xL; dicho aumento alcanza la significación estadística ($P < 0,05$) a una dosis de daunomicina de 1,0 μM ; en cuanto al silenciamiento de las proteínas Bcl-2 y Bax, no tiene ningún efecto sobre la muerte celular en presencia de las dosis de 0,4 μM y 1,0 μM de DNM.

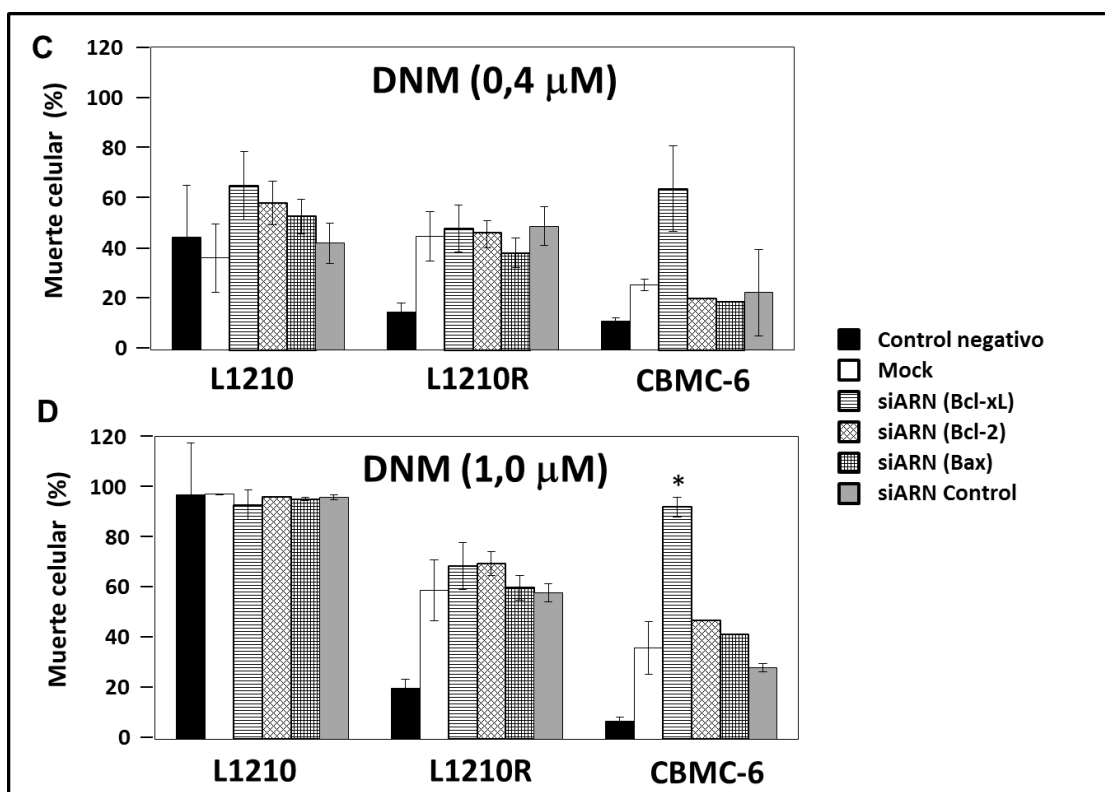


Figura 4.18C-D. Efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 en la viabilidad de las líneas celulares leucémicas L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas en presencia de DNM. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, cultivadas en presencia de dos dosis distintas de DNM (0,4 μM y 1,0 μM). El porcentaje de muerte celular se determinó mediante tinción con ioduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan: * $P < 0,05$. N=5.

En la **figura 4.19** se puede observar la muerte celular provocada por el silenciamiento de las proteínas de la familia Bcl-2 al someter a las células a un

tratamiento con daunomicina a dosis cercanas a la IC_{50} de cada tipo celular y posterior utilización de la técnica de MTT; esta técnica permite medir la muerte celular eliminando la interferencia que provoca la muerte celular debida al silenciamiento de

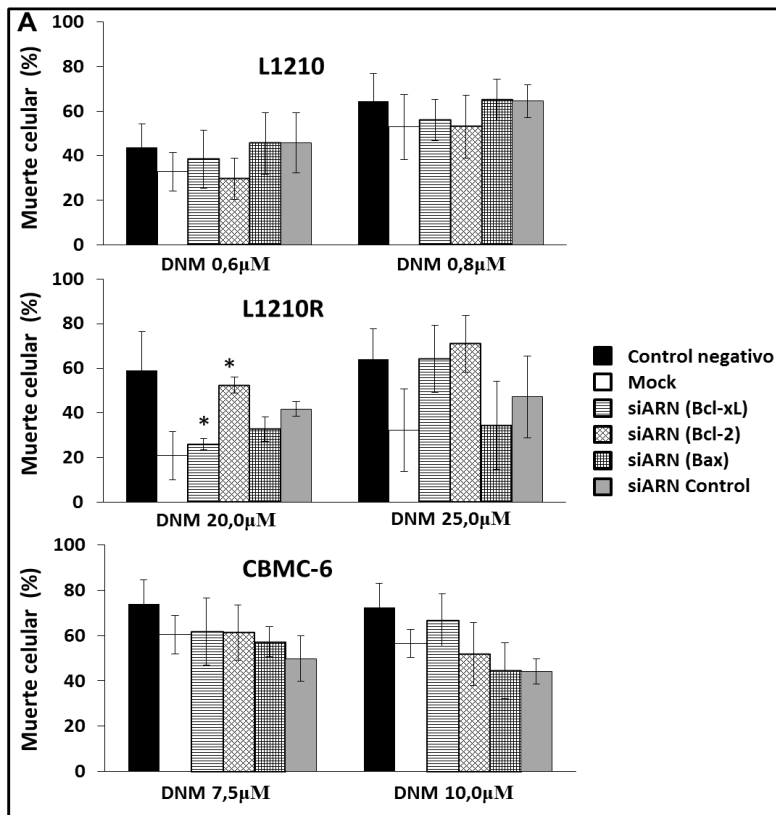


Figura 4.19 (A). Efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 en la viabilidad de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 tras ser cultivadas con dosis de DNM cercanas a la IC_{50} de cada tipo celular. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, tratadas con DNM. El porcentaje de muerte celular se determinó mediante la técnica de MTT. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 4.

proteínas, puesto que considera el 100% de supervivencia la absorbancia obtenida en el cultivo sin tratamiento con DNM (ver Materiales y Métodos). En las líneas celulares L1210 y CBMC-6 no se observan diferencias significativas en ningún silenciamiento. Sin embargo, en las células L1210R se observa un aumento de la muerte celular en presencia de DNM (dosis 20 μ M) al silenciar Bcl-2 ($P<0,05$) y una disminución de la muerte celular al silenciar Bcl-xL ($P<0,05$), estas

diferencias se siguen observando en el tratamiento con la dosis de 25 μ M aunque en este caso, no son estadísticamente significativas. Estos ensayos ponen de manifiesto la importancia de la proteína Bcl-2 en la resistencia a daunomicina de las células L1210R.

Para comprobar si el aumento de muerte celular era debido al hecho de que las proteínas de la familia Bcl-2 afectaran a la funcionalidad y/o expresión de P-gp, se realizaron ensayos de tinción con rodamina después de los silenciamientos de estas proteínas y se midió la acumulación de la misma mediante citometría de flujo. Adicionalmente se estudió la expresión de P-gp de los citados extractos celulares,

mediante western-blot. En la **figura 4.19B** se pueden observar los resultados de la acumulación de rhodamina 123 tras el silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2. En las líneas celulares L1210 y L1210R no se observaron diferencias significativas en la acumulación de rhodamina 123 con ningún silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2. En la línea celular CBMC-6 se encontró un aumento considerable (aunque sin diferencias estadísticamente significativas) de la acumulación de rhodamina 123 al silenciar Bcl-xL. Así se pudo comprobar que el silenciamiento de las proteínas de la familia Bcl-2 no afecta significativamente la funcionalidad de P-gp, aunque deberían realizarse más experimentos para determinar la relación entre la funcionalidad de la bomba de extrusión de fármacos y Bcl-xL en la línea celular CBMC-6.

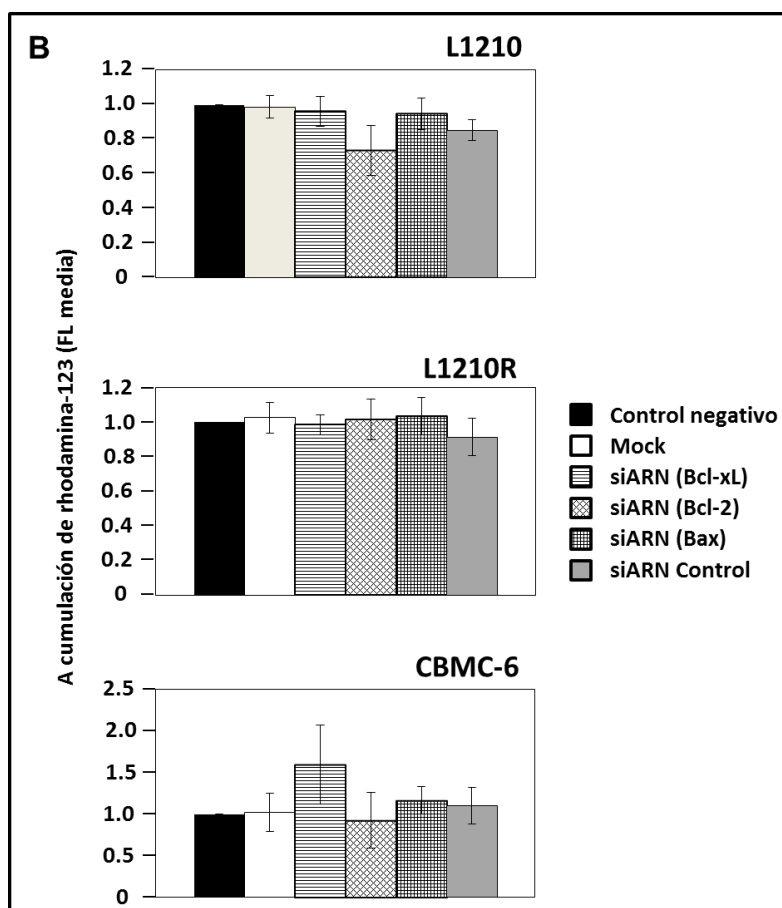


Figura 4.19 (B). Efecto del silenciamiento de Bcl-xL, Bcl-2 y Bax sobre la acumulación de rhodamina 123 en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, cultivadas a 37°C en presencia de rhodamina. Los niveles de acumulación de rho se determinaron mediante análisis por citometría de flujo. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. El nivel de acumulación de rhodamina se normalizó respecto al nivel de la muestra control negativo de cada tipo celular dándole el valor 1 a ésta. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N=6

En la **figura 4.19C** se muestran los resultados de expresión de la proteína P-gp, analizada mediante western-blot, tras silenciamiento de las proteínas de la familia Bcl-2. No se muestran los resultados para la línea celular L1210 porque estas células no expresan la proteína P-gp y, por tanto, no se observó ninguna expresión de esta proteína al realizar los análisis mediante western-blot. En las líneas celulares L1210R y CBMC-6

no se observaron diferencias significativas respecto a la expresión de P-gp tras los silenciamientos de las proteínas de la familia Bcl-2, indicando que dichas proteínas no influyen de manera significativa en la expresión de la bomba de extrusión de fármacos.

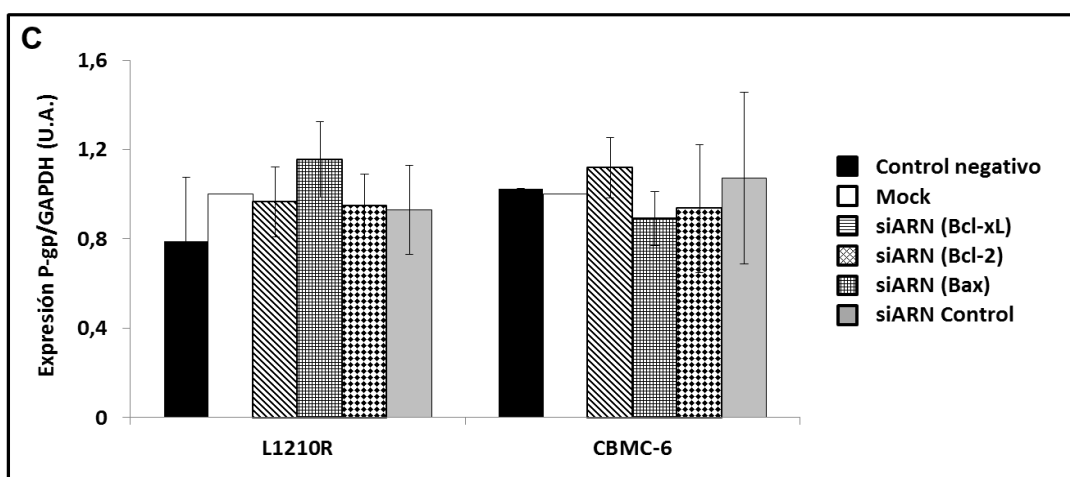
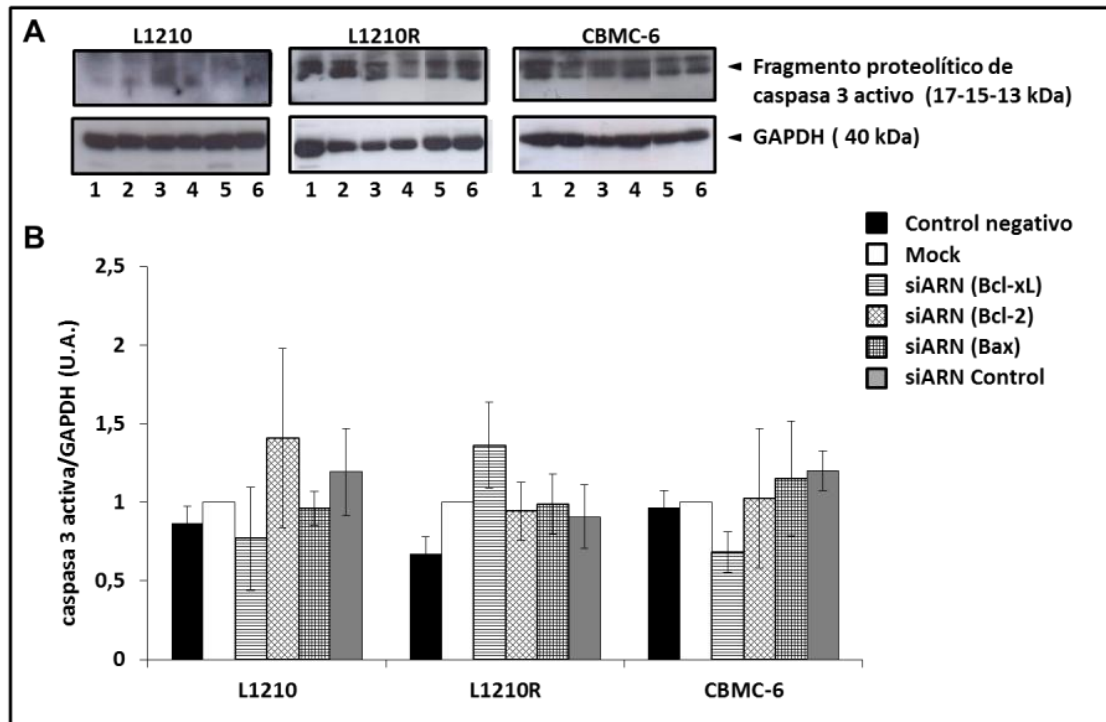


Figura 4.19 (C) Efecto del silenciamiento de Bcl-xL, Bcl-2 y Bax sobre la expresión de P-gp en las líneas celulares L1210R y CBMC-6. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, se procedió a la extracción proteica y análisis por western-blot, utilizando un anticuerpo específico para la detección de P-gp. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. La normalización de los niveles de expresión de P-gp se realizó tomando como referencia el valor de la muestra *Mock* en cada tipo celular. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N=9.

5.3 Efecto del silenciamiento de proteínas de la familia Bcl-2 sobre los niveles de caspasa 3 activa.

Para intentar comprobar la posible relación entre las proteínas de la familia Bcl-2 y la activación de caspasa 3 se midió la cantidad del fragmento activo de caspasa 3 después del silenciamiento de Bcl-xL, Bcl-2 y Bax en las tres líneas celulares murinas.

En la figura 4.20A-B se pueden observar western-blot representativos de la expresión de los fragmentos proteolíticos de caspasa 3 después de silenciar las proteínas de la familia Bcl-2, así como la representación gráfica de la media de todos los ensayos realizados. Se muestra que en ningún caso se producen diferencias estadísticamente significativas, destacando solo un pequeño aumento de caspasa 3 activa al silenciar Bcl-2 y disminución al silenciar Bcl-xL en las células L1210, en las células L1210R sólo destaca un aumento de caspasa 3 al silenciar Bcl-xL y en la línea celular CBMC-6 sólo es destacable una disminución de caspasa 3 al silenciar Bcl-xL.



5.4 Efecto del silenciamiento de P-gp sobre los niveles de proteínas de la familia Bcl-2.

Finalmente, para comprobar si la expresión de P-gp podía afectar de alguna forma a la expresión de proteínas de la familia Bcl-2, se realizaron análisis de extractos celulares mediante western-blot en las tres líneas celulares murinas, y se analizó la expresión de las proteínas Bcl-xL y Bcl-2 y Bax tras el silenciamiento de P-gp.

En la **figura 4.21A** se observa que en las células L1210 el silenciamiento de P-gp no tiene ningún efecto sobre la expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, puesto que los niveles de expresión de estas proteínas al silenciar P-gp no son significativamente diferentes a los niveles obtenidos en los controles negativos. Sin embargo, en las células L1210R hay que destacar un aumento en la expresión de la proteína Bcl-2 al silenciar P-gp1b; aunque la alta variabilidad obtenida en los controles

negativos hace necesario realizar más experimentos para determinar si dicha diferencia podría ser estadísticamente significativa.

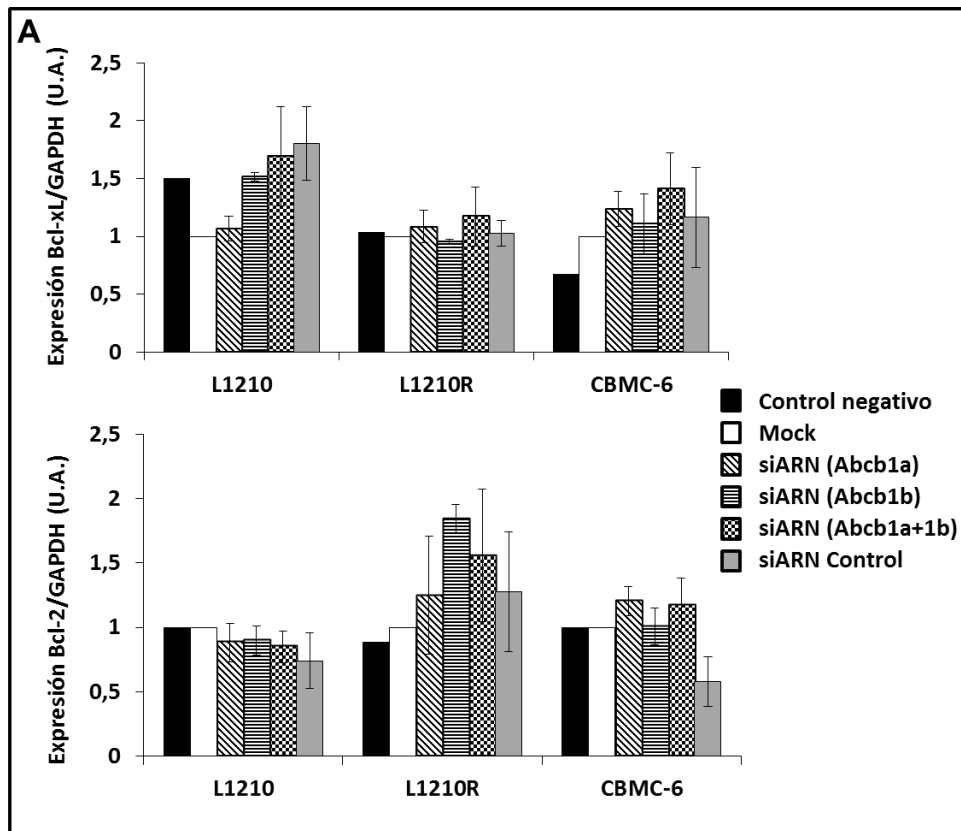


Figura 4.21 (A). Efecto del silenciamiento de P-gp 1a (Abcb1a) sobre la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL y Bcl-2. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, se procedió a la extracción proteica y análisis por western-blot, utilizando anticuerpos específicos para la detección de las proteínas Bcl-xL y Bcl-2. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 5.

En la figura 4.21B se observa que el silenciamiento de P-gp no tiene ningún efecto sobre la expresión de la proteína anti-apoptótica Bax en ninguno de los tres tipos celulares estudiados.

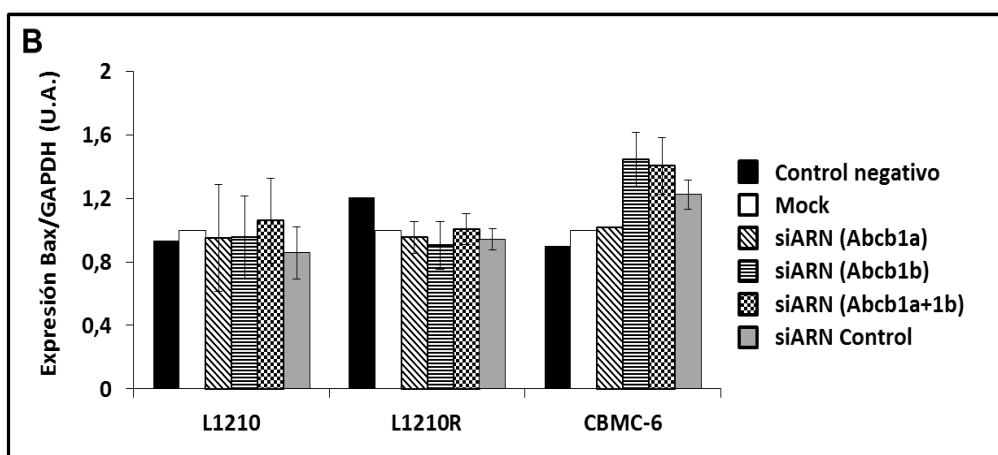


Figura 4.21 (B) Efecto del silenciamiento de Pg-p 1a (Abcb1a) sobre la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax. Las células fueron transfectadas con los distintos oligonucleótidos (siARNs), cultivadas durante 48 h para permitir la recuperación de las mismas y, seguidamente, se procedió a la extracción proteica y análisis por western-blot utilizando un anticuerpo específico para la detección de la proteína Bax. El control negativo se refiere a las células que no han sido sometidas a electroporación ni transfectadas con ningún siARN. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N= 5.

6. Señalización intracelular. Contribución de la familia de MAPK a la muerte celular inducida por frío en células con fenotipo MDR.

Las rutas de señalización intracelular de MAPKs y de PI3K/Akt son las principales rutas que transmiten señales de estrés y supervivencia/muerte celular, por lo tanto decidimos estudiar su implicación en el proceso de sensibilidad colateral observado en las células con fenotipo MDR de nuestro modelo celular murino.

6.1. Cinética de activación de proteínas MAPK en células leucémicas sensibles y resistentes a fármacos cultivadas a 4°C.

La cinética de activación de las proteínas MAPKs se estudió midiendo el nivel de fosforilación de estas proteínas en las tres líneas celulares en condiciones de estrés hipotérmico y a distintos tiempos (desde 0 hasta 8 horas de incubación a 4°C).

En la **figura 4.22** se puede observar la evolución de la fosforilación de ERK dependiendo del tiempo de exposición al frío. Se comprobó que, en condiciones fisiológicas de cultivo, la fosforilación de la proteína ERK es similar en los tres tipos

celulares estudiados. En las células L1210 la fosforilación de ERK se mantiene muy estable durante todo el tiempo de exposición al frío. En las células L1210R la activación de la proteína ERK disminuye a los 30 minutos del cultivo en frío ($P<0,01$), manteniéndose estable hasta el tiempo de 4 horas de exposición al frío, a partir del cual vuelve a disminuir, permaneciendo aún más bajo en los tiempos 6 y 8 horas ($P<0,05$) y siendo significativamente menor al nivel de fosforilación de la línea celular L1210 al tiempo 8 horas ($P<0,01$). En las células CBMC-6 se produce un pequeño aumento de la activación de esta ruta a los 30 minutos de cultivo en frío, volviendo al nivel inicial tras 1 hora de exposición al frío, y manteniendo un perfil similar al encontrado en las células L1210 pero con un nivel de fosforilación ligeramente inferior a esta línea celular.

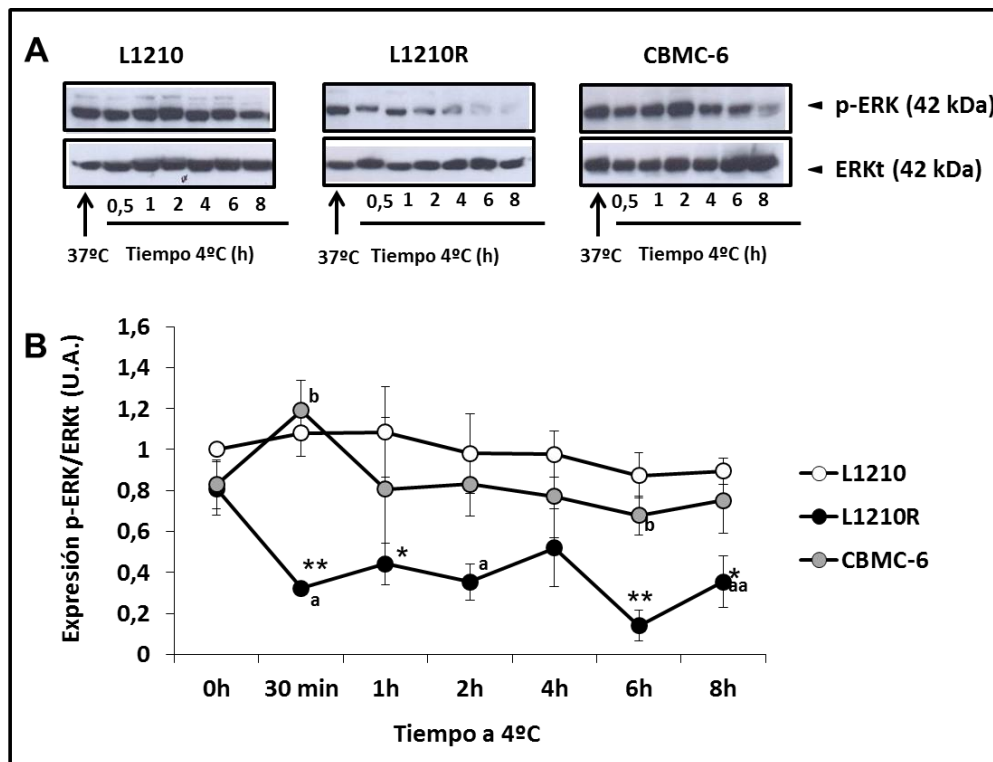


Figura 4.22. Evolución de la activación de ERK (fosforilación) en las líneas celulares leucémicas (L1210, L1210R y CBMC-6) en respuesta a estrés hipotérmico. **(A)** Western-blot representativos de los niveles de ERK fosforilado a distintos tiempos de exposición a 4°C, en cada una de las líneas celulares leucémicas, y **(B)** Representación gráfica de los niveles de fosforilación de ERK en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 incubadas a distintos tiempos de exposición al frío. Como control de carga se utilizaron los niveles de expresión de proteína ERK total (ERKt). La normalización del densitometrado se ha realizado tomando como referencia la expresión obtenida para la muestra de tiempo 0 h de la línea celular L1210. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas respecto al nivel de fosforilación basal (0h) de cada tipo celular de * $P<0,05$; ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas respecto al nivel de fosforilación de JNK de la línea celular L1210 (a) o respecto a la línea celular L1210R (b) de a/b $P<0,05$; aa/bb $P<0,01$ y aaa/bbb $P<0,001$. N=3.

JNK es una de las principales proteínas perteneciente a la familia de MAPKs, además, esta ruta de señalización intracelular tiene una especial importancia debido a su influencia sobre la expresión de glicoproteína P (Sui H. et al, 2012). En la **figura 4.23** se puede observar la evolución de la fosforilación de esta proteína en los tres tipos celulares estudiados en condiciones fisiológicas (0 horas) y bajo condiciones de estrés hipotérmico a distintos tiempos, desde 30 minutos hasta 8 horas. Lo primero que se puede destacar son las diferencias basales de fosforilación de esta proteína entre las tres líneas celulares (a 37°C), observándose que la activación de esta ruta intracelular es prácticamente nula en las células L1210R comparado con la activación en las líneas celulares L1210 y CBMC-6 ($P < 0,001$ comparado con L1210 y $P < 0,01$ comparado con CBMC-6).

En las células L1210 se produce una respuesta al estrés por frío mediante un aumento mantenido de la fosforilación de la proteína JNK hasta el tiempo de 2 horas, donde la activación de esta ruta supone más del triple de la activación inicial (con

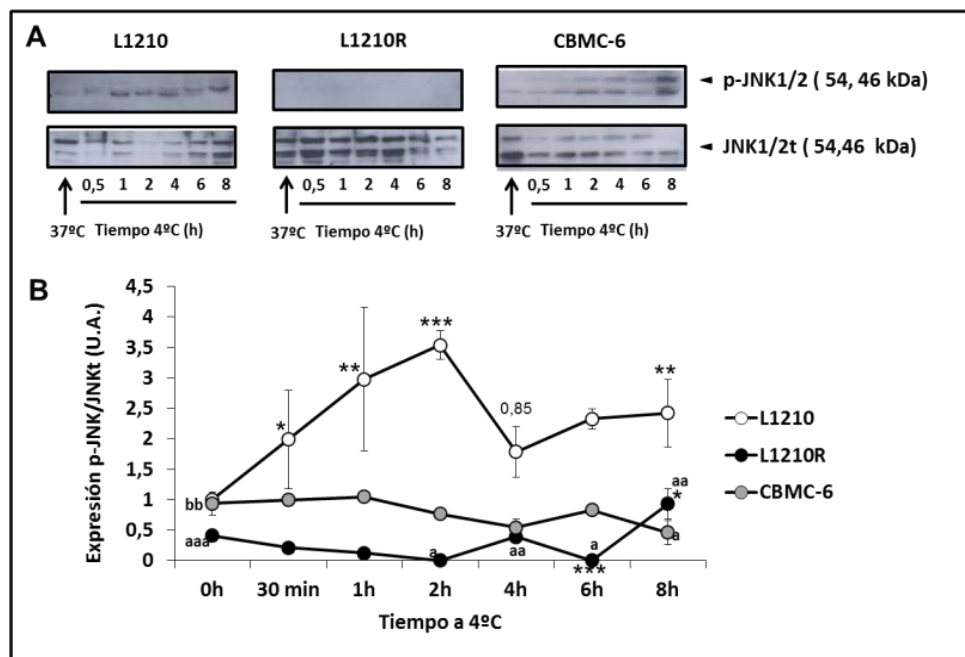


Figura 4.23. Evolución de la activación de JNK (fosforilación) en las líneas celulares leucémicas (L1210, L1210R y CBMC-6) en respuesta a estrés hipotérmico. (A) Western-blots representativos mostrando los niveles de JNK fosforilado a distintos tiempos de exposición a 4°C, en cada una de las líneas celulares leucémicas, y (B) Representación gráfica de los niveles de fosforilación de JNK en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 incubadas a distintos tiempos de exposición al frío. Como control de carga se utilizaron los niveles de expresión de proteína JNK total (JNKt). La normalización del densitometrado se ha realizado tomando como referencia la expresión obtenida para la muestra de tiempo 0 h de la línea celular L1210. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos respresentan diferencias estadísticamente significativas respecto al nivel de fosforilación basal (0h) de cada tipo celular de * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$. Las letras representan diferencias estadísticamente significativas respecto al nivel de fosforilación de JNK de la línea celular L1210 (a) o respecto a la línea celular L1210R (b) de a/b $P < 0,05$; aa/bb $P < 0,01$ y aaa/bbb $P < 0,001$. N=3.

diferencias significativas a tiempos 30 minutos, 1 y 2 horas); a partir de aquí, se produce una pequeña disminución de la activación hasta las 4 (donde alcanza el doble de la activación inicial) y aumenta un poco a las 6 y 8 horas, tiempos en los que el nivel de activación se encuentra entre el doble y triple de la inicial ($P < 0,01$ para el tiempo de 8 horas). En las células L1210R, la fosforilación de esta proteína es muy baja en condiciones basales, disminuyendo aún más en las primeras horas de cultivo en frío y produciéndose un pequeño aumento de la fosforilación a las 4 horas, seguido de una bajada a las 6 horas y finalmente un mayor aumento a las 8 horas bajo condiciones de estrés por frío ($P < 0,05$); en ningún momento llega a alcanzar los niveles de activación de esta ruta que se producen en las células L1210 ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ dependiendo del tiempo). Respecto a las células CBMC-6, el nivel basal de fosforilación se encuentra próximo al de las células L1210 pero, a diferencia de éstas, se mantiene estable en los primeros momentos y la activación de esta ruta de señalización disminuye a partir de 1 hora de exposición al frío; continuando esta disminución de fosforilación hasta las 4 horas, tiempo al que se produce un pequeño aumento en la activación que se prolonga hasta las 6 horas y finaliza con una disminución de la misma a las 8 horas de cultivo en frío. Los niveles de fosforilación son significativamente diferentes en el tiempo 8 horas respecto a la respuesta que se produce en la línea celular L1210 ($P < 0,05$) y dejan de existir diferencias en estos tiempos de exposición al frío si comparamos con los resultados de la línea celular L1210R.

En la **figura 4.24** se puede observar la evolución de la fosforilación de p38 en los tres tipos celulares estudiados a medida que transcurre el tiempo de exposición al frío. Puede comprobarse que, inicialmente, la fosforilación de la proteína p38 es similar en todos los tipos celulares. En cuanto a la evolución en condiciones de estrés hipotérmico, en las células L1210 hay una disminución de la fosforilación de p38 a los 30 minutos de incubación a 4°C, que se recupera al tiempo de 1 hora, manteniéndose más o menos estable a partir de este momento; en las células L1210R la fosforilación de p38 es similar a la de la línea celular L1210, presentando una disminución inicial más prolongada en el tiempo y acercándose al nivel de fosforilación de las L1210 a partir del tiempo 2 horas, manteniéndose en este nivel hasta el final del tiempo de incubación; en la línea celular CBMC-6 el perfil y nivel de fosforilación de p38 es muy parecido al observado en la línea celular L1210, produciéndose un aumento de dicho nivel a partir

del tiempo 6 horas, aunque la variabilidad encontrada en estos puntos concretos al realizar los análisis de western-blot fue muy alta.

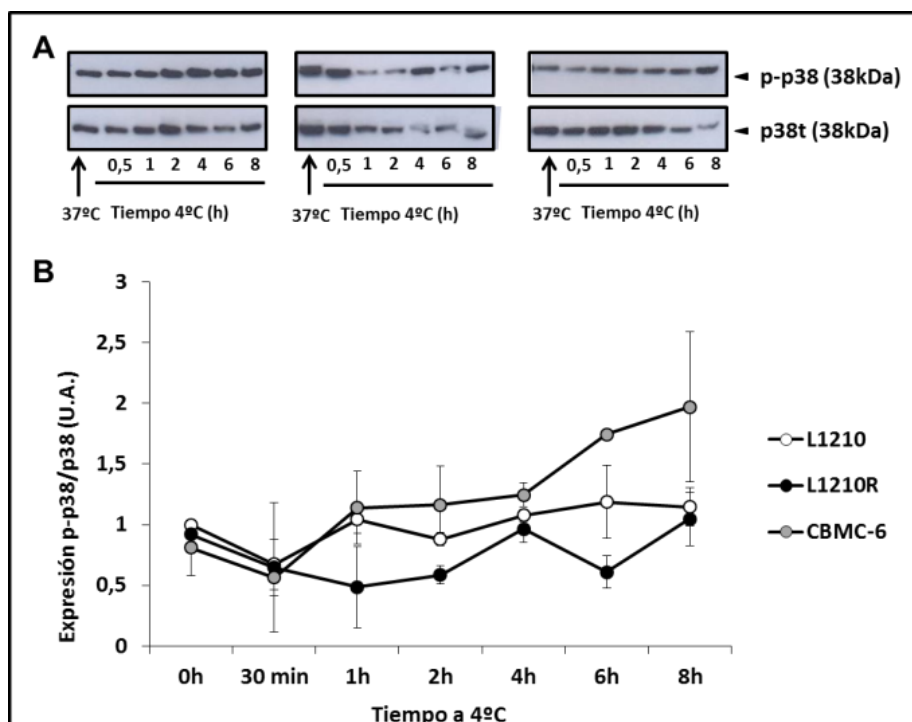


Figura 4.24. Evolución de la activación de p38 (fosforilación) en las líneas celulares leucémicas (L1210, L1210R y CBMC-6) en respuesta a estrés hipotérmico. (A) Western-blots representativos de los niveles de p38 fosforilado a distintos tiempos de exposición a 4°C, en cada una de las líneas celulares leucémicas y (B) Representación gráfica de los niveles de fosforilación de p38 en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 incubadas a distintos tiempos de exposición al frío. Como control de carga se utilizan los niveles de expresión de proteína p38 total (p38t). La normalización del densitometrado se ha realizado tomando como referencia la expresión obtenida para la muestra de tiempo 0 h de la línea celular L1210. Las barras de error representan \pm error típico de la media. N=3.

6.2. Efecto de los inhibidores de MAPK y PI3K/Akt sobre la sensibilidad colateral al frío de células leucémicas con fenotipo MDR.

Con objeto de analizar las rutas de señalización intracelular implicadas en el proceso de sensibilidad colateral al frío así como las conexiones existentes entre ellas en cada una de las tres líneas celulares leucémicas de ratón, se realizaron experimentos preliminares que, en la mayoría de los casos, suponen el punto de partida para la realización de nuevos ensayos que confirmen de forma categórica los resultados iniciales mostrados en esta Tesis.

6.2.1. Viabilidad en condiciones de estrés por frío.

Para comprobar la influencia de las rutas de MAPKs y la ruta de PI3K/Akt sobre el proceso de apoptosis bajo condiciones de estrés por frío, se realizaron cultivos celulares exponiéndolos a una temperatura de 4°C o 37°C durante 24 horas y en presencia de inhibidores de estas rutas celulares. En la **figura 4.25** se puede observar el resultado de estos ensayos.

Los inhibidores utilizados fueron SB203580 como inhibidor de la ruta de p38, PD98059 como inhibidor de la ruta de ERK, SP600125 como inhibidor de la ruta de JNK y LY294002 como inhibidor de la ruta de PI3K/Akt (ver Materiales y Métodos para recordar mecanismos de actuación de inhibidores). Además, se utilizó la combinación de inhibidores PD98059 y SP600125 para inhibir conjuntamente las rutas de ERK y JNK, puesto que en los primeros ensayos dichos inhibidores tuvieron un efecto más claro sobre la supervivencia celular en frío.

En la línea celular L1210 cultivada a 37°C, la inhibición de las rutas de JNK, de PI3K/Akt y la inhibición conjunta de las rutas JNK/ERK, aumentó la muerte celular ($P<0,01$, $P<0,05$ y $P<0,01$ respectivamente), mostrando así que estas rutas son importantes para la supervivencia celular en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la inhibición de dichas rutas de señalización no tuvo ningún efecto sobre la muerte celular de las células L1210 en condiciones de estrés por frío.

En las células L1210R cultivadas a 37°C, la inhibición de las rutas de JNK (con SP600125), PI3K/Akt (con LY294002) así como la inhibición conjunta de las rutas de JNK y ERK (con PD98059+SP600125) produjo un aumento significativo de la muerte con respecto a las mismas células no tratadas con inhibidores ($P<0,001$, $P<0,01$ y $P<0,001$ respectivamente). Dicho efecto fue cualitativamente igual al observado en la línea parental L1210, aunque cuantitativamente el aumento de muerte celular fue mayor en las células L1210R que en la línea celular L1210. Cuando se utilizaron los inhibidores en células L1210R cultivadas en condiciones de estrés por frío, tanto la inhibición de las rutas de ERK, JNK, PI3K/Akt como la inhibición conjunta de rutas ERK y JNK produjo una reversión de la muerte celular inducida por frío, que fue estadísticamente significativa ($P<0,001$ en todos los casos excepto para la inhibición de la ruta de PI3K/Akt en la que fue $P<0,05$).

En la línea celular CBMC-6 cultivada a 37°C, la inhibición de la ruta de JNK con SP600125 y la inhibición conjunta de las rutas de ERK y JNK, utilizando la combinación de inhibidores PD98059+SP600125, produjo un aumento significativo de la muerte celular ($P<0,001$) similar al observado en las otras dos líneas celulares; sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en las líneas celulares L1210 y L1210R, no se observó un aumento significativo de la muerte celular con la inhibición de la ruta de PI3K/Akt. Cuando se realizaron los cultivos de la línea celular CBMC-6 a una temperatura de 4°C, la inhibición de las rutas celulares de ERK, JNK, así como la inhibición conjunta de éstas produjo una reversión significativa de la muerte celular inducida por frío ($P<0,01$); sin embargo, no se observó ningún cambio significativo cuando se inhibió la ruta de PI3K/Akt con el inhibidor LY294002.

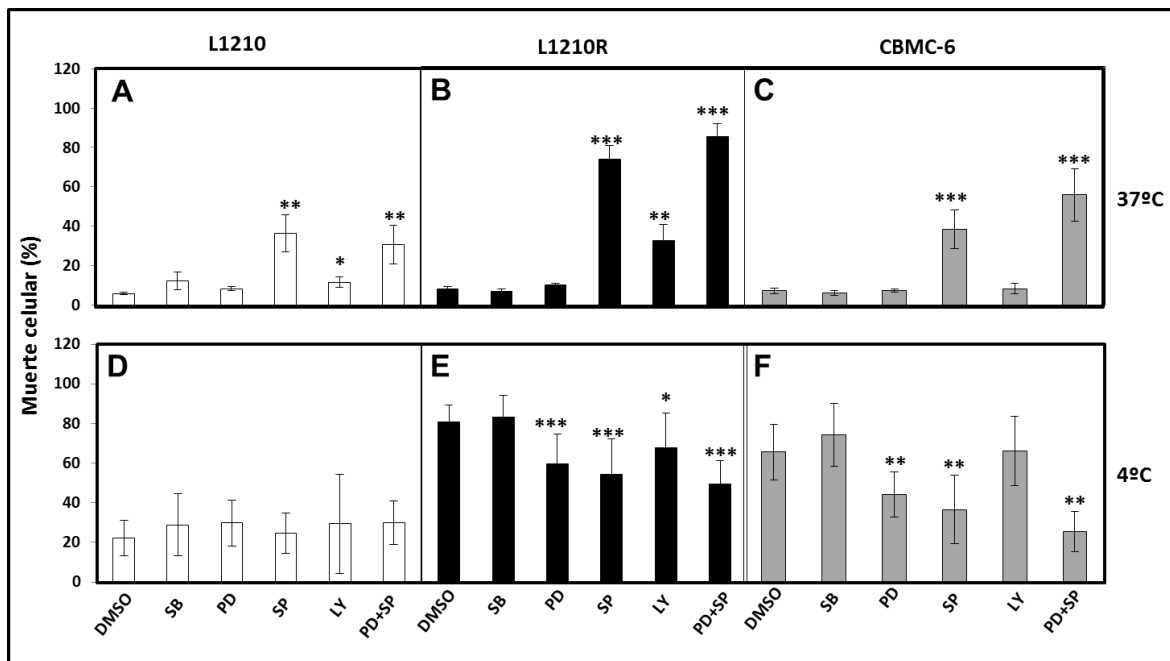


Figura 4.25. Efecto de inhibidores de MAPK y Akt/PKB en la viabilidad de las líneas leucémicas de ratón (L1210, L1210R y CBMC-6) incubadas a 37°C y a 4°C durante 24 h. (A-C) Representación gráfica de la muerte celular observada en las tres líneas leucémicas incubadas a 37°C. (D-F) Representación gráfica de la muerte celular observada en las tres líneas leucémicas incubadas a 4°C. Los inhibidores farmacológicos utilizados han sido los siguientes: **SB203580**: Inhibidor de la ruta de p38, **PD98059**: Inhibidor de la ruta de ERK, **SP600125**: Inhibidor de la ruta de JNK, **LY294002**: Inhibidor de la ruta de PI3P/Akt, **PD+SP**: Inhibidores de las rutas de ERK y JNK. Como control hemos utilizado cultivos celulares a los que se ha añadido Dimetil-sulfóxido (DMSO), que es la solución utilizada para resuspender los distintos inhibidores. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan los distintos niveles de significación estadística; * $P<0,05$; ** $P<0,01$. N=10-12.

En resumen, se puede observar que en las tres líneas celulares la ruta de JNK es fundamental para su supervivencia en condiciones fisiológicas, mientras que la ruta de PI3K/Akt es importante para la supervivencia de la línea celular L1210R pero no para

las otras dos líneas celulares (sólo se observa un ligero aumento en la muerte de células L1210). En cuanto a la implicación de dichas rutas en la sensibilidad colateral al frío de las líneas celulares L1210R y CBMC-6, la inhibición de las rutas de ERK y JNK revierte dicha muerte celular, siendo este efecto mayor cuando se inhiben al mismo tiempo ambas rutas. En las células CBMC-6, cuando se inhibe la ruta de PI3K/Akt, se observa un comportamiento intermedio en comparación con los resultados observados en los tipos celulares L1210 y L1210R. Así, en condiciones fisiológicas el inhibidor de PI3K/Akt no tiene ningún efecto en la viabilidad de dichas células y en condiciones de estrés por frío, dicho inhibidor no revierte la muerte celular (comportamiento similar al observado en células L1210). La inhibición de la ruta de p38 no tiene ningún efecto sobre la supervivencia de las tres líneas celulares estudiadas.

6.2.2. Expresión de P-gp.

Para comprobar el efecto que puede ejercer la señalización a través de las rutas de MAPKs y PI3K/Akt sobre la expresión de P-gp, se midió la expresión de dicha proteína mediante western-blot. Para ello las tres líneas celulares leucémicas fueron cultivadas a 37°C o a 4°C durante 24 horas en presencia de inhibidores de MAPK o de PI3K/Akt para, seguidamente, obtener extractos celulares en los que analizar la expresión de dicha proteína.

En la **figura 4.26** se puede observar cómo se produce un aumento de la expresión de P-gp en la línea celular L1210R al inhibir la ruta de p38 utilizando el inhibidor SB203580, sin observarse cambios al utilizar los demás inhibidores, excepto una pequeña disminución al inhibir la ruta de PI3K/Akt con el inhibidor LY294002. Sin embargo, ninguna de las diferencias observadas en este tipo celular tuvo significación estadística. En cuanto a los resultados en la línea células CBMC-6, no se observó ningún cambio significativo de la expresión de P-gp al inhibir las rutas de señalización, aunque la inhibición de PI3K/Akt (LY294002) produjo un aumento de la expresión de P-gp cercano a la significación estadística.

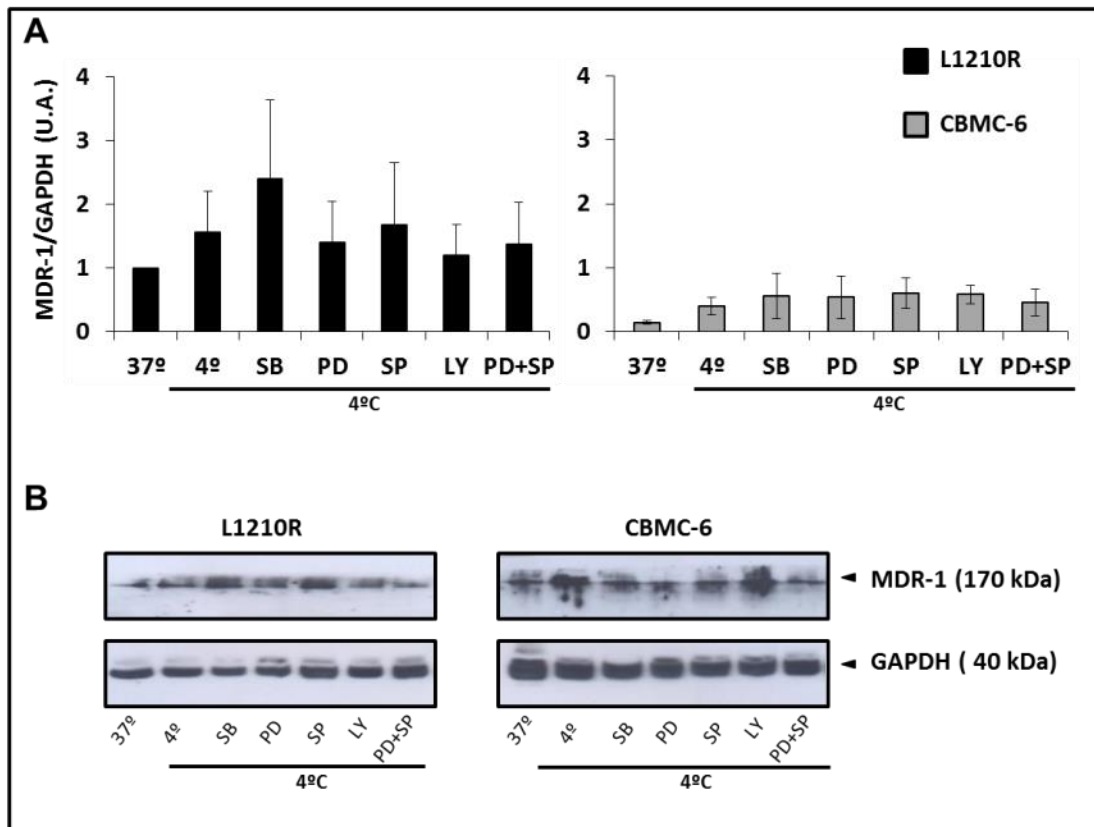


Figura 4.26. Efecto de los inhibidores farmacológicos de MAPK y de PI3K/Akt en los niveles de expresión de MDR-1 en células L1210R y CBMC-6 cultivadas en condiciones de estrés hipotérmico. (A) Representación gráfica de la expresión de MDR-1 en los tipos celulares L1210R y CBMC-6 cultivados a 37°C y a 4°C durante 24 h y utilizando los siguientes inhibidores de rutas celulares: **SB203580 (SB)**: Inhibidor de la ruta de p38, **PD98059 (PD)**: Inhibidor de la ruta de ERK, **SP600125 (SP)**: Inhibidor de la ruta de JNK, **LY294002 (LY)**: Inhibidor de la ruta de PI3P/Akt, **PD+SP**: Inhibidores de las rutas de ERK y JNK. La normalización de la expresión de las proteínas se realizó tomando como referencia el valor obtenido para la muestra a 37°C de la línea celular L1210R. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan * $P < 0,05$. N=4. **(B)** Western-blots representativos de la expresión de MDR-1 en células L1210R y CBMC-6 tratadas con inhibidores farmacológicos y cultivadas a 4°C.

6.3. Redes de comunicación intracelular entre MAPKs en condiciones de estrés por frío.

Para comprobar si en nuestro modelo celular las redes de comunicación entre las moléculas señalizadoras estudiadas se mantenía en las sublíneas celulares resistentes a fármacos o, por el contrario, sufría alteraciones con respecto a la línea parental, se realizaron cultivos de las tres líneas celulares en condiciones fisiológicas (37°C sin inhibidores) y en condiciones de estrés por frío durante 24 horas sin inhibición y en presencia de los siguientes inhibidores: SB203580 (ruta de p38), PD98059 (ruta de ERK), SP600125 (ruta de JNK), LY294002 (ruta de PI3K/Akt) y la combinación de

PD98059 + SP600125 y se analizó, mediante western-blot, el efecto de los mismos sobre la fosforilación de MAPKs.

En la **figura 4.27** se puede observar los niveles de fosforilación de la proteína ERK en las tres líneas celulares leucémicas cultivadas a 37°C, a 4°C con y sin inhibidores de las rutas de señalización intracelular de MAPK y de PI3K/Akt.

Al estudiar la fosforilación de ERK, en las células L1210 se observó una disminución de la misma en condiciones de estrés por frío, aumentando dicha fosforilación al inhibir las rutas de p38, JNK y PI3K/Akt, y disminuyendo al inhibir la ruta de ERK, como era esperable dado que dicho inhibidor PD98059 actúa aguas arriba en la ruta de señalización de dicha proteína. En cuanto a la inhibición conjunta de las rutas de JNK y ERK, se obtuvieron resultados muy variables.

En las células L1210R, la fosforilación de ERK disminuyó al exponer las células a estrés hipotérmico. Respecto a los niveles de p-ERK a 4°C, se observó un aumento, aunque no significativo, cuando se utilizó el inhibidor de la ruta de p38 y aún mayor al inhibir la ruta de JNK; sin embargo, al inhibir las rutas de ERK y de forma conjunta las rutas de ERK y JNK se produjo una disminución de la fosforilación de ERK similar en ambos casos. Finalmente, la inhibición de la ruta de PI3K/Akt generó resultados muy variables.

En la línea celular CBMC-6, la fosforilación de ERK disminuyó cuando las células se expusieron a una temperatura de 4°C. Respecto a los niveles de p-ERK a 4°C, se observó un aumento de p-ERK al inhibir las rutas de p38, de JNK y de PI3K/Akt, aunque dichos aumentos no alcanzaron en ningún caso la significación estadística. Finalmente, se observó una disminución de p-ERK, con valores cercanos a la significación estadística, al inhibir la ruta de ERK y en la inhibición conjunta de las rutas de JNK y ERK.

En resumen, el patrón de fosforilación de ERK es muy similar en las tres líneas celulares (L1210, L1210R y CBMC-6) incubadas a 4°C y en presencia de los distintos inhibidores.

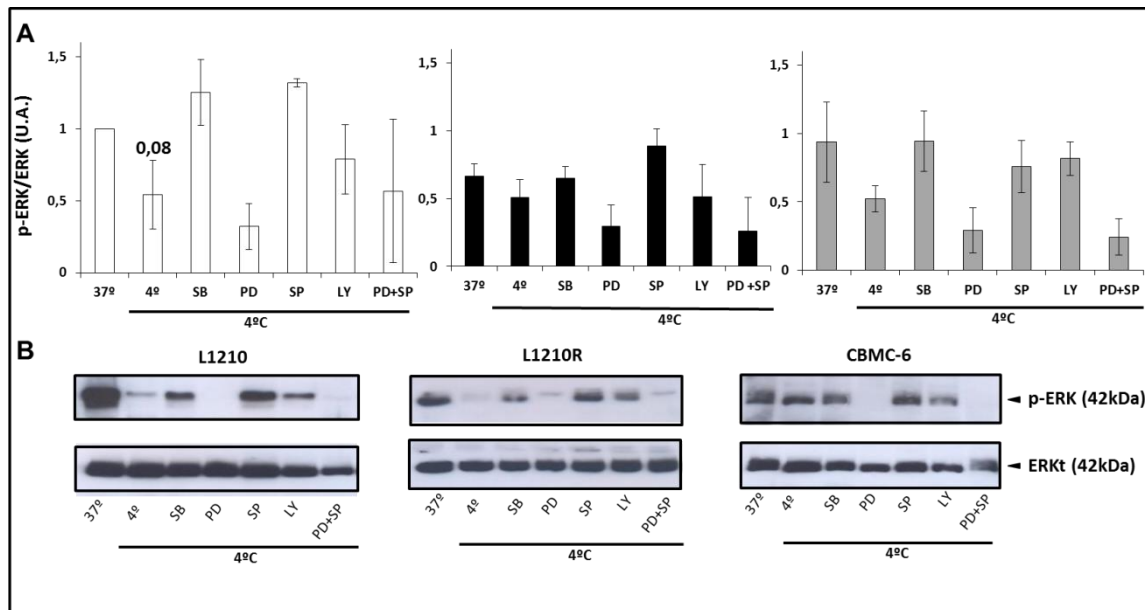


Figura 4.27 .Efecto de los inhibidores farmacológicos en la activación (fosforilación) de ERK en células L1210, L1210R y CBMC-6 sometidas a estrés hipotérmico. (A) Representación gráfica de la activación (fosforilación) de la proteína ERK1/2 (44/42 kDa) en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas a 37°C , y a 4°C durante 24 h con los siguientes inhibidores de rutas celulares: SB203580 (SB): Inhibidor de la ruta de p38, PD98059 (PD): Inhibidor de la ruta de ERK, SP600125 (SP): Inhibidor de la ruta de JNK, LY294002 (LY): Inhibidor de la ruta de PI3P/Akt, PD+SP: Inhibidores de las rutas de ERK y JNK. La normalización se realizó tomando como referencia el nivel de fosforilación de ERK en las células L1210 a 37°C. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$. $N=4$. **(B)** Western-blots representativos de la activación de ERK en células L1210, L1210R y CBMC-6 tratadas con inhibidores farmacológicos e incubadas a 4 °C.

En la **figura 4.28** se pueden observar los niveles de fosforilación de JNK en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas durante 24 hrs a 37°C o a 4°C en presencia o no de inhibidores de MAPKs y de PI3K/Akt.

En las células L1210, la incubación durante 24 h en frío induce un aumento de la fosforilación de JNK, como ya se había observado a tiempos cortos (de 30 minutos a 8 h) en los experimentos representados en la **figura 4.23**. Al estudiar el efecto de los inhibidores sobre la activación de JNK, se vio que la inhibición de la ruta de p38 no afecta a la fosforilación de JNK y la inhibición de la ruta de JNK provoca un aumento de la fosforilación de esta proteína; en cambio sí se observó una disminución de la fosforilación de JNK al inhibir las rutas de ERK y PI3K/Akt y también en la inhibición conjunta de las rutas de JNK y ERK. Ninguno de estos cambios fue estadísticamente significativo. Según se ha explicado en la sección Material y Métodos, un aumento de la fosforilación de JNK al utilizar el inhibidor SP600125 es esperable, puesto que la inhibición se produce aguas abajo de esta proteína y ello puede producir un efecto de acumulación de JNK fosforilada aunque el resto de la ruta de señalización esté inhibida.

En cuanto a las células L1210R, la incubación en frío durante 24 h no produjo cambios significativos en la fosforilación de JNK, ni con la utilización de la mayoría de inhibidores, aunque sí se observa una tendencia al aumento de la fosforilación de esta proteína al inhibir las rutas de p38 y ERK.

En las células CBMC-6, la fosforilación de JNK aumenta al someterse las células a estrés hipotérmico. Respecto a los niveles de MAPK en células cultivadas a 4°C sin inhibidores se observa un aumento de la fosforilación de JNK al inhibir las rutas de p38 y JNK, manteniéndose estable el nivel de fosforilación al inhibir las rutas de ERK, PI3K/Akt y cuando se utilizan conjuntamente los inhibidores de las rutas de JNK y ERK.

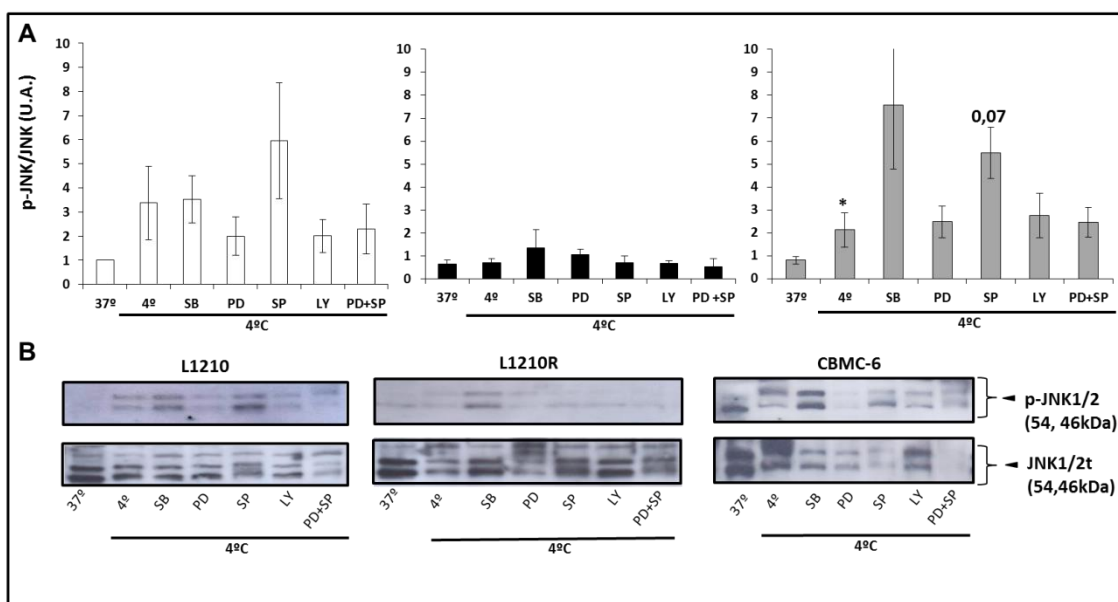


Figura 4.28. Efecto de los inhibidores farmacológicos en la activación (fosforilación) de JNK, células L1210, L1210R y CBMC-6 sometidas a estrés hipotérmico. **(A)** Representación gráfica de la activación (fosforilación) de la proteína JNK1/2/3 (46, 54, 57 kDa) en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas a 37°C, y a 4°C durante 24 h con los siguientes inhibidores de rutas celulares: **SB203580 (SB)**: Inhibidor de la ruta de p38, **PD98059 (PD)**: Inhibidor de la ruta de ERK, **SP600125 (SP)**: Inhibidor de la ruta de JNK, **LY294002 (LY)**: Inhibidor de la ruta de PI3K/Akt, **PD+SP**: Inhibidores de las rutas de ERK y JNK. La normalización de las muestras se realizó tomando como referencia el valor de fosforilación de la muestra a 37°C de la línea celular L1210. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$. $N = 4$. **(B)** Western-blot representativos de la activación de JNK en células L1210, L1210R y CBMC-6 tratadas con inhibidores farmacológicos e incubadas a 4 °C.

En resumen, el patrón de fosforilación de JNK es muy similar en las líneas celulares L1210 y CBMC-6 incubadas a 4°C y en presencia de los distintos inhibidores, sin embargo, además de los bajos niveles de fosforilación de JNK en la línea celular L1210R, los niveles de fosforilación de JNK en dichas células, cultivadas a 4°C en

presencia de los distintos inhibidores sigue un patrón distinto al observado en las otras dos líneas celulares.

En la **figura 4.29** se observan los niveles de fosforilación de la proteína p38 en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas a 37°C y a 4°C en presencia o ausencia de los inhibidores de las rutas de señalización intracelulares.

En la línea celular L1210, se observó una disminución de los niveles de p-p38 al someter las células a estrés hipotérmico y se mantuvo en un nivel similar a éste al inhibir las rutas de ERK y PI3K/Akt. En cambio, en la inhibición de la propia ruta p38 se produjo un aumento de la fosforilación de ésta proteína, siendo mayor, y cercano a la significación estadística, al inhibir la ruta de JNK. Finalmente sí hubo un aumento significativo ($P < 0,05$) en la inhibición conjunta de las rutas de ERK y JNK.

En la línea celular L1210R, la fosforilación de p38 sí presentó un patrón distinto al de las células L1210, observándose una disminución de la fosforilación de esta proteína al inhibir las rutas de p38, ERK y la inhibición conjunta de las rutas de JNK y ERK. Se observó una ligera disminución de fosforilación de p38 al inhibir la ruta de PI3K/Akt y no se produjo ningún efecto al inhibir solamente la ruta de JNK.

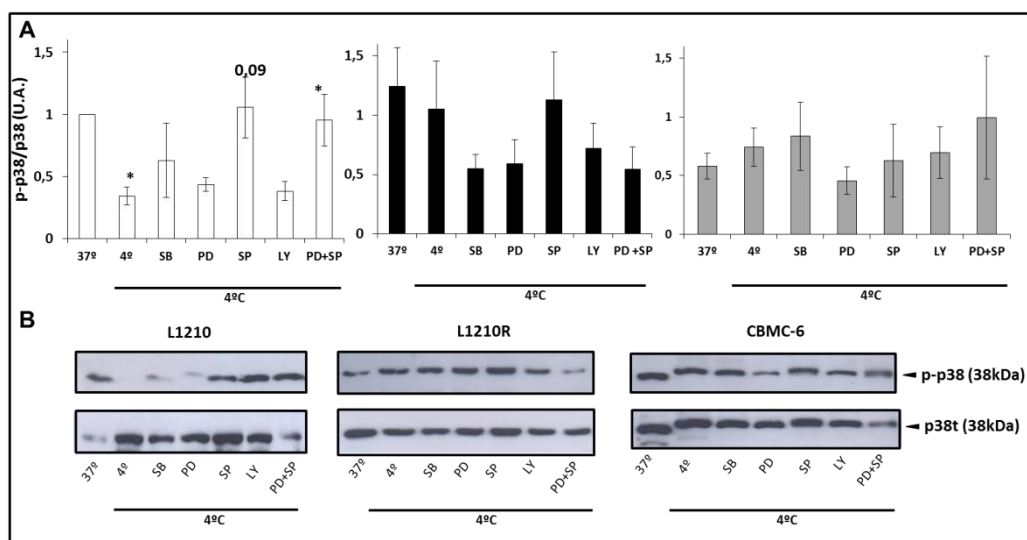


Figura 4.29. Efecto de los inhibidores farmacológicos en la activación (fosforilación) de p38 en células L1210, L1210R y CBMC-6 sometidas a estrés hipotérmico. (A) Representación gráfica de la activación (fosforilación) de la proteína p38(38kDa) en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 cultivadas a 37°C, y a 4°C durante 24 h con los siguientes inhibidores de rutas celulares: **SB203580 (SB)**: Inhibidor de la ruta de p38, **PD98059 (PD)**: Inhibidor de la ruta de ERK, **SP600125 (SP)**: Inhibidor de la ruta de JNK, **LY294002 (LY)**: Inhibidor de la ruta de PI3K/Akt, **PD+SP**: Inhibidores de las rutas de ERK y JNK. Las barras de error representan \pm error típico de la media. Los asteriscos representan * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$. $N=4$. **(B)** Western-blot representativos de la activación de p38 en células L1210, L1210R y CBMC-6 tratadas con inhibidores farmacológicos e incubadas a 4 °C.

En cuanto a la fosforilación de la proteína p38 en la línea celular CBMC-6, se pudo observar un pequeño aumento cuando las células se sometieron a estrés hipotérmico. En cuanto a la utilización de inhibidores no se observaron cambios, excepto una disminución al usar el inhibidor de ERK y una pequeña disminución al inhibir la ruta de JNK y la de PI3K/Akt, sin diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

En resumen, el patrón de fosforilación de p38 es distinto en las tres líneas celulares murinas (L1210, L1210R y CBMC-6) incubadas a 4°C y en presencia de los distintos inhibidores.

7. Producción de Citocinas. Papel de las citocinas en respuesta a estrés celular.

Se ha descrito que glicoproteína P, entre otras funciones, podría actuar como bomba extrusora de citocinas, contribuyendo así, mediante otro mecanismo distinto a los descritos anteriormente, al balance de supervivencia/muerte celular de las líneas celulares que la expresan a través del control en la secreción de dichas moléculas. Por este motivo, decidimos explorar posibles cambios en el perfil de citocinas intracelulares y presentes en el sobrenadante de cultivo de las líneas celulares leucémicas tanto en condiciones fisiológicas como de estrés celular (exposición al frío o al fármaco anti-neoplásico daunomicina).

7.1. Determinación de citocinas intracelulares.

En la **figura 4.30A** se representa el resultado del ensayo de determinación de citocinas intracelulares. Se analizaron los niveles de 10 citocinas distintas, especificadas en la figura, en células cultivadas a 37°C, cultivadas a 4°C durante 24 horas o cultivadas en presencia de DNM (1,5 µM) durante 24 horas. Seguidamente, se compararon los perfiles de producción de citocinas obtenidos en cada uno de los tres tipos celulares y en las distintas condiciones de cultivo especificadas anteriormente.

Así, se pudo observar como el perfil de citocinas intracelulares es similar para las tres líneas celulares cultivadas en condiciones fisiológicas, destacando la presencia de IL-1 α , IL-5, IFN- γ y TNF- α . Cuando dichas líneas celulares se someten a incubación a

4°C durante 24 horas, aunque los perfiles de citocinas se mantienen similares a los observados en condiciones fisiológicas, hay que destacar algunas diferencias. Así, por ejemplo, con el frío se produce un aumento general de los niveles de las citocinas citadas, destacando el aumento de IL-1 α en células L1210 y CBMC-6, el aumento de IL-5 en los tres tipos celulares, de TNF- α en células L1210 y CBMC-6 y el aumento de GM-CSF en células L1210 y L1210R. En cuanto a las células cultivadas en presencia de DNM, hay que destacar el aumento de IL-1 α en células L1210, el aumento de IFN- γ en los tres tipos celulares y la drástica disminución de los niveles de TNF- α en células L1210 (destacados en la **figura 4.30B**), mientras que dichos niveles permanecieron similares a los detectados en condiciones basales para los otros dos tipos celulares.

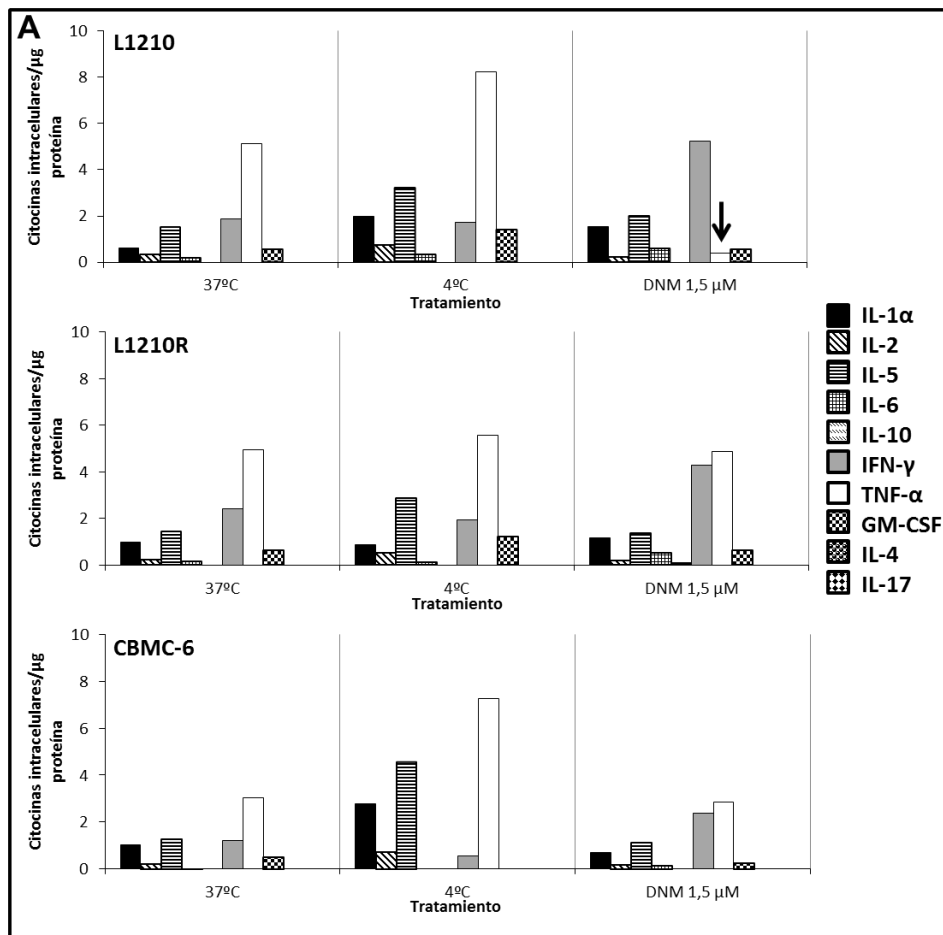


Figura 4.30 A. Producción de citocinas en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 ante estímulos de estrés. Representación gráfica del perfil de citocinas intracelulares al cultivar las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 en condiciones de cultivo fisiológicas (37°C), de estrés hipotérmico (4°C) y de tratamiento con DNM a una concentración 1,5 μ M (DNM 1,5 μ M) durante 24 horas; medidas por citometría de flujo (10.000 eventos). N=1. Las flechas señalan el cambio más destacado en la producción de citocinas.

En resumen, estos resultados indican que las citocinas que marcan la diferencia entre células sensibles y resistentes a fármacos varían con las distintas condiciones de estrés celular, siendo necesario destacar el drástico descenso de los niveles de TNF- α en células parentales cultivadas en presencia de DNM, mientras que dichos niveles se mantuvieron constantes en los otros dos tipos celulares. Será necesario realizar nuevos experimentos con objeto de determinar el papel de cada una de dichas citocinas en la supervivencia/muerte celular en condiciones de estrés por exposición a DNM.

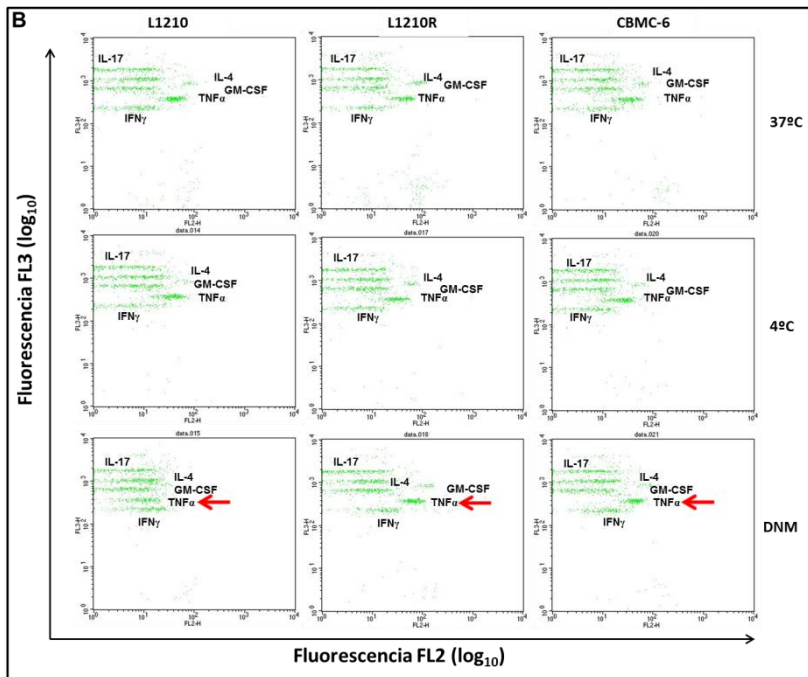


Figura 4.30B. Producción de TNF α en los tipos celulares L1210, L1210R y CBMC-6 ante estímulos de estrés. Análisis por citometría de flujo de la concentración de citocinas en los extractos proteicos de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 en condiciones de cultivo fisiológico (37°C), de estrés hipotérmico (4°C) y de tratamiento con DNM (1,5 μ M) durante 24 horas; medidas por citometría de flujo (10.000 eventos). N=1. Las flechas señalan un cambio destacado de producción de citocinas frente a tratamiento con DNM.

7.2. Determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo

En cuanto a los perfiles de citocinas observados en los sobrenadantes de los cultivos celulares (**figura 4.31A**), solo se detectaron niveles apreciables de citocinas en las células incubadas a 4°C. Así, se observaron niveles similares de IL-2, IL-5, IFN- γ y GM-CSF en los tres tipos celulares estudiados. Hay que destacar la presencia de IL-1 α exclusivamente en los sobrenadantes de cultivos de células L1210R y CBMC-6 incubadas a 4°C (destacado en la **figura 4.31B**), mientras que no se detectaron niveles apreciables de dicha citocina en las células parentales cultivadas en esas mismas condiciones. Igual que en el caso anterior, es necesario realizar nuevos experimentos con objeto de determinar el papel de cada citocina en la supervivencia/muerte celular en condiciones de estrés por exposición a bajas temperaturas.

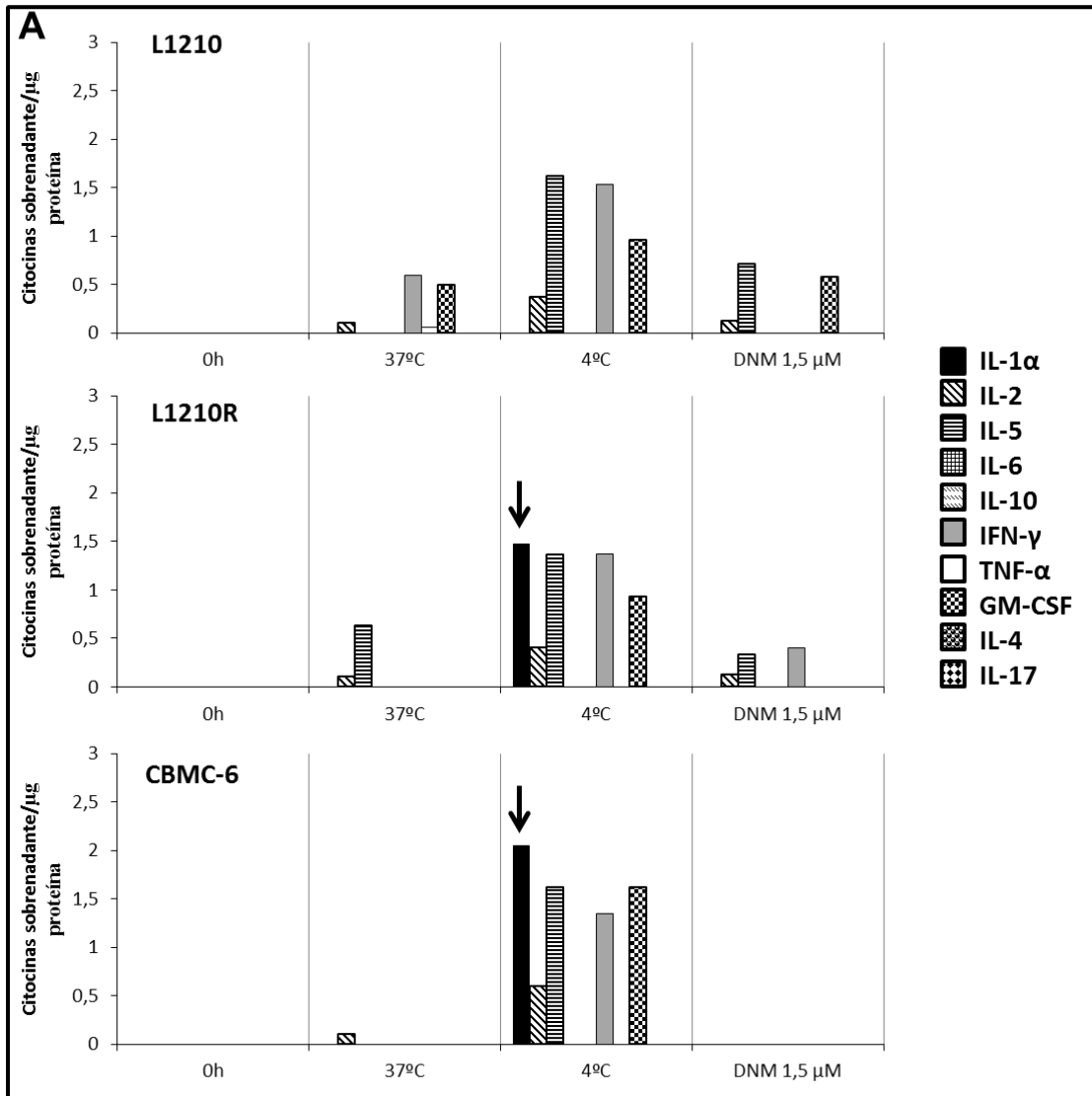


Figura 4.31A. Secreción de citocinas en las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 ante estímulos de estrés. Representación gráfica de la concentración de citocinas en el medio de cultivo de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 en condiciones de cultivo fisiológicas (37°C), de estrés hipotérmico (4°C) y de tratamiento con DNM (1,5 μM) durante 24 horas; medidas por citometría de flujo (10.000 eventos). N=1. Las flechas señalan un cambio destacado en secreción de citocinas al sobrenadante de cultivo.

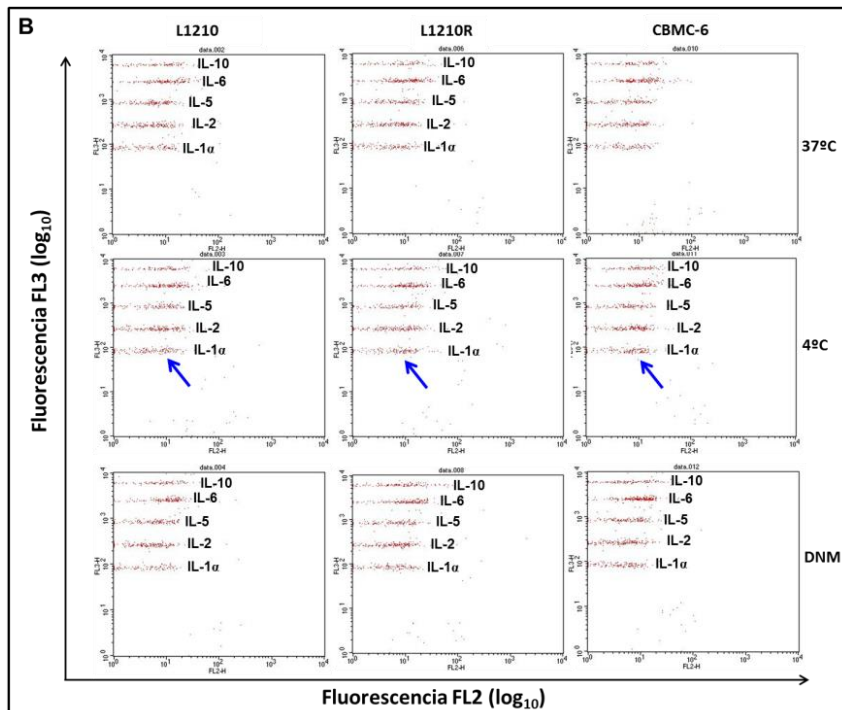


Figura 4.31B. Secreción de IL-1 α en los tipos celulares L1210, L1210R y CBMC-6 ante estímulos de estrés. Análisis de citometría de flujo de la concentración de citocinas en los sobrenadantes procedentes de los cultivos de las líneas celulares L1210, L1210R y CBMC-6 en condiciones de cultivo fisiológico (37°C), de estrés hipotérmico (4°C) y de tratamiento con DNM (1,5 μ M) durante 24 horas; medidas por citometría de flujo (10.000 eventos). N=1. Las flechas señalan un cambio destacado en la secreción de citocinas en respuesta a estrés hipotérmico.

8. Obtención de líneas leucémicas humanas resistentes a daunomicina.

Con objeto de determinar si el proceso de sensibilidad colateral al frío era exclusivo del modelo celular murino de resistencia a fármacos o, por el contrario se trataba de un proceso más general, asociado a la adquisición de fenotipo MDR y más concretamente a la expresión de P-gp, presente en distintas especies, nos planteamos el establecimiento de un modelo celular humano constituido por células leucémicas parentales y por la sublínea derivada con fenotipo MDR. Para ello, partimos de una línea celular linfoblástica humana de tipo B denominada IM-9. El establecimiento de líneas celulares leucémicas resistentes al fármaco anti-neoplásico daunomicina se realizó, igual que en células L1210R del modelo celular murino, mediante exposición continuada y creciente de las células parentales (IM-9), al fármaco anti-neoplásico DNM. Después de 2 años y medio de tratamientos sucesivos basados en ciclos de exposición al fármaco DNM, con aumento progresivo de la dosis, se consiguieron desarrollar líneas celulares leucémicas humanas con fenotipo MDR. Así, se obtuvieron las sublíneas celulares resistentes a daunomicina, denominadas IM-9R_{0.5}, IM-9R_{1.3} e IM-9R_{1.5}, nombrados de esta forma en la que el número después de la letra R representa el valor de la IC₅₀ de cada línea celular en presencia de DNM (μ M).

8.1. Características morfológicas

La principal característica morfológica que suele aparecer asociada al fenotipo MDR es una mayor agregación celular debido a la sobreexpresión de proteínas responsables de las uniones intercelulares y de las uniones entre las células y la matriz extracelular. En la **figura 4.32** se pueden observar fotos de los cultivos de las células IM-9, IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5} en condiciones fisiológicas. En dicha figura se puede comprobar cómo las células con fenotipo MDR tienden a agregarse (señalizado con flechas blancas), probablemente debido a la sobreexpresión de moléculas de adhesión celular, mientras que en el cultivo de las células parentales no se observan agregados celulares.

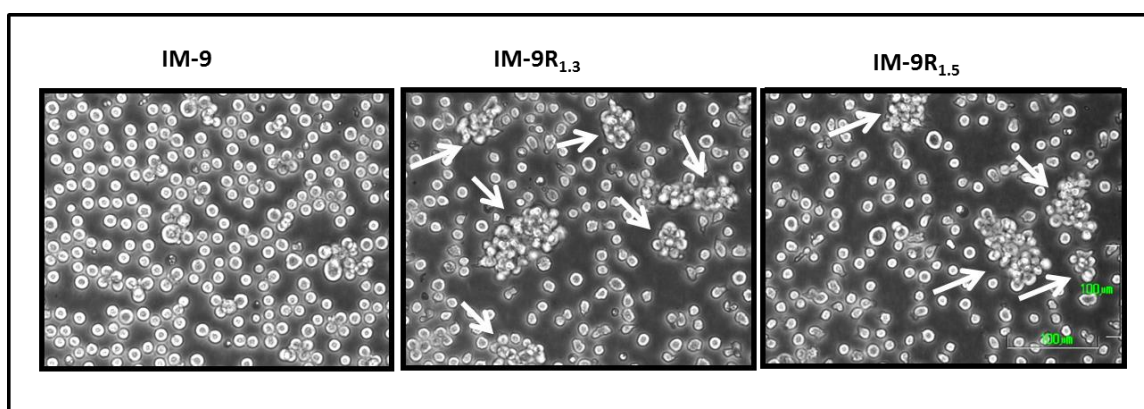


Figura 4.32 .Viabilidad de células leucémicas humana incubadas a 37°C y en condiciones de estrés hipotérmico a 4°C. Fotografía de la observación a través de microscopía de la integridad celular de los tipos celulares IM-9, IM-9R1.3 e IM-9R1.5 incubadas a 37° y 4°C durante 24 horas. Las flechas indican la aparición de agregados celulares características de las células con fenotipo MDR.

8.2. Respuesta al estrés por tratamiento farmacológico

Con el objetivo de determinar la IC₅₀ y el índice de resistencia (IR) de cada sublínea celular, se realizaron cultivos de cada una de ellas (incluido el fenotipo silvestre o *wild type*) en presencia de distintas dosis de DNM durante un periodo de 48 horas. La supervivencia celular se midió mediante la técnica de MTT.

En la **figura 4.33A** se presenta el porcentaje de supervivencia celular obtenido tras el tratamiento de los cultivos celulares con distintas dosis de DNM. Para cada línea celular se consideró como el 100% de supervivencia celular la obtenida en los cultivos sin DNM (controles). En dichos ensayos se utilizaron dosis crecientes del fármaco hasta

llegar a un máximo de 4,0 μM . En las células IM-9 se puede observar una rápida disminución de la supervivencia celular, llegando al 15% con la dosis 0,4 μM y permaneciendo por debajo del 10% de supervivencia a partir de la dosis 0,6 μM ; en las células IM-9R_{0,5} se observa una mayor supervivencia tras el tratamiento con DNM, con una disminución de la viabilidad celular más lenta que en las células IM-9, llegando al 15% con la dosis 0,6 μM y permaneciendo por debajo del 10% de forma estable a partir de la dosis 1,0 μM . Las células IM-9R_{1,3} presentaron aún una mayor resistencia al tratamiento con DNM, con una disminución de la supervivencia celular más lenta que en las células IM-9, alcanzando un 20% de supervivencia celular con la dosis de 4,0 μM y presentando diferencias significativas respecto a los resultados obtenidos con las células IM-9, desde la dosis 1,0 μM hasta la dosis 2,5 μM ($P < 0,05$). Las células IM-9R_{1,5} presentaron una evolución similar a las células IM-9R_{1,3}, con un mayor porcentaje de supervivencia celular en algunas dosis, las diferencias respecto a las células IM-9 fueron estadísticamente significativas desde la dosis 0,6 μM hasta la dosis 2,5 μM ($P < 0,05$) y la significación estadística aumentó en la dosis 4,0 μM ($P < 0,01$).

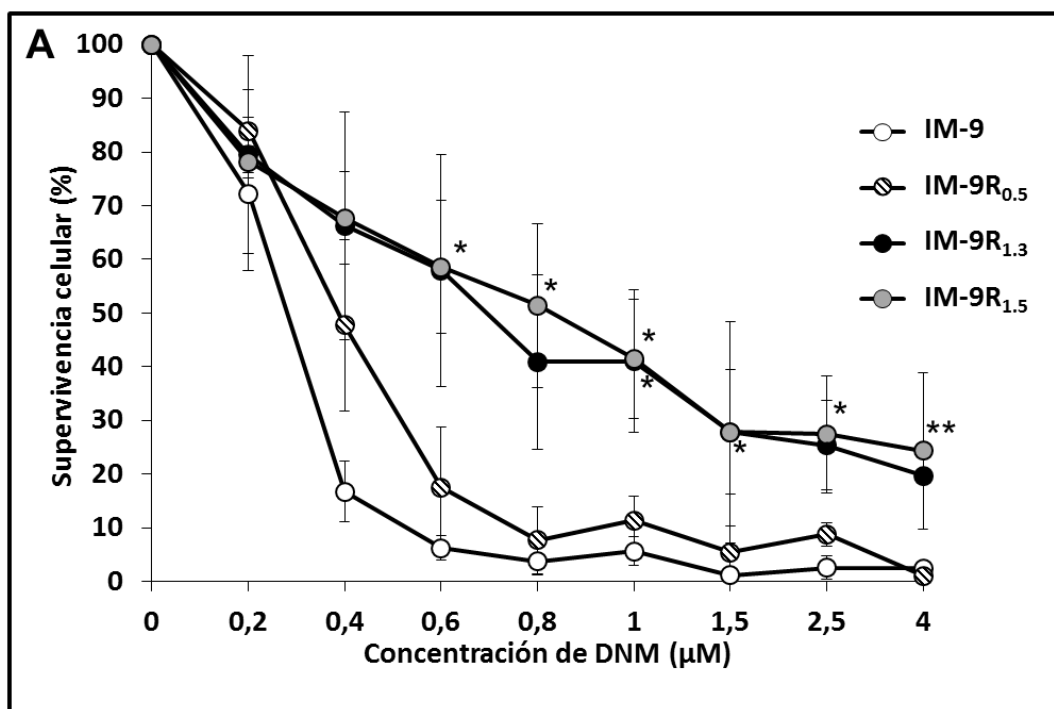


Figura 4.33A. Porcentajes de viabilidad de líneas celulares leucémicas murinas en presencia de DNM. La línea celular parental (IM-9) y las sublíneas resistentes (IM-9R_{0,5}, IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5}) fueron incubadas durante 48 horas en presencia de dosis crecientes de DNM. Los niveles de muerte celular se determinaron mediante la utilización de la técnica de MTT. Los puntos representan la media \pm error típico. Los asteriscos representan Los niveles de significación estadística respecto al control sin DNM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. N=4.

En la **figura 4.33B** se representa el dato de IC_{50} para cada fenotipo celular obtenido a partir de los ensayos de MTT descritos en el párrafo anterior. Se puede comprobar cómo la IC_{50} de las células IM-9R_{0,5} es ligeramente superior a la IC_{50} de las células IM-9 y, en las células IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5} es significativamente superior ($P < 0,01$ para IM-9R_{1,3} y $P < 0,05$ para IM-9R_{1,5}).

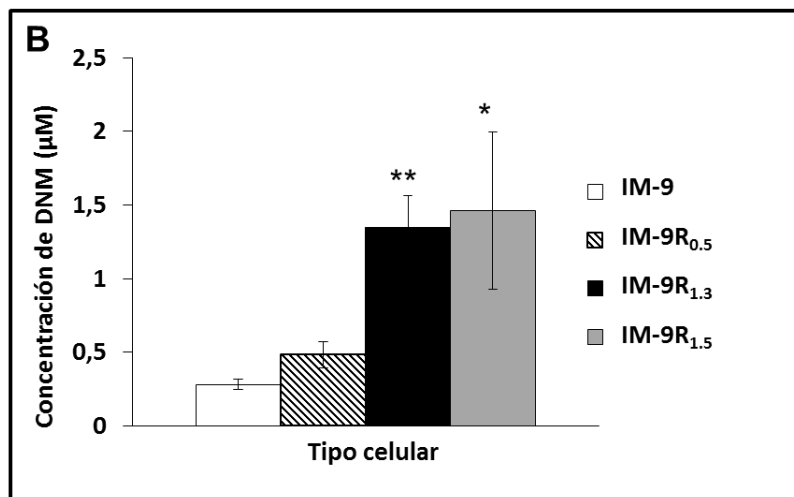


Figura 4.33B .Valores de IC_{50} obtenidos para las líneas celulares leucémicas humanas incubadas con DNM. Las líneas celulares (IM-9, IM-9R_{0,5}, IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5}) fueron incubadas en presencia de dosis crecientes de DNM y se determinaron los valores de la IC_{50} para cada una de ellas. Los histogramas representan la media \pm error típico. Los asteriscos representan los niveles de significación estadística respecto al valor de IC_{50} obtenido en la línea parental; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. N=4.

En la **tabla 4.IV** se representa el dato de IC_{50} de cada sublínea celular así como el índice de resistencia (IR). El IR representa las veces que es más resistente un fenotipo celular frente a un tratamiento respecto al fenotipo wild type y se calcula dividiendo el valor de IC_{50} de la línea celular resistente entre el valor de IC_{50} de la línea parental de la que procede. Según la definición de Zhang et al. (2010), una línea celular se puede considerar como resistente cuando su IR es superior a 3, es decir, la resistencia a un fármaco es 3 veces mayor que la resistencia de la línea celular parental. Así se puede observar en esta tabla que los fenotipos celulares IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5} se pueden considerar como sublíneas resistentes establecidas, mientras que el fenotipo IM-9R_{0,5} no se puede considerar como resistente atendiendo a este criterio de clasificación.

Línea celular	IC ₅₀	IR
IM-9	0,28 ± 0,03	1,00
IM-9R _{0.5}	0,48 ± 0,09	1,71
IM-9R _{1.3}	1,35 ± 0,21	4,82
IM-9R _{1.5}	1,46 ± 0,53	5,21

Tabla 4.IV. Valores de IC₅₀ e IR (índice de resistencia) obtenidos para las líneas celulares leucémicas humanas incubadas con DNM. Las líneas celulares (IM9, IM-9R_{0.5}, IM-9R_{1.3} y IM-9R_{1.5}) fueron incubadas en presencia de dosis crecientes de DNM y se determinaron los valores de la IC₅₀ e IR para cada una de ellas. IC₅₀ es la dosis de DNM que provoca la muerte de la mitad de la población, el IR es un índice que se calcula dividiendo la IC₅₀ de la línea celular resistente entre la IC₅₀ de la línea celular sensible (si es mayor de 3 se puede considerar que la línea celular es resistente al fármaco). N=4.

8.3. Expresión y actividad de P-gp.

Con objeto de determinar si uno de los mecanismos de resistencia a fármacos de las nuevas líneas celulares obtenidas era la expresión de una bomba de extrusión de fármacos, como P-gp, nos planteamos el estudio de la expresión de dicha proteína en la línea parental IM-9 y en las sublíneas resistentes. Para ello se obtuvieron los extractos celulares de cada una de las líneas a estudiar y se realizaron análisis mediante western-blot para determinar la expresión de la proteína P-gp (MDR-1). La media de expresión de P-gp en los extractos celulares (células IM-9, IM-9R_{1.3} e IM-9 R_{1.5}) se representa en la gráfica de la **figura 4.34A-B**, en la que se puede observar que la expresión de esta proteína es aproximadamente 10 veces mayor en las células IM-9R_{1.3} y aproximadamente 12 veces mayor en las células IM-9R_{1.5} respecto a la expresión observada en las células IM-9; esta diferencia fue significativa (P<0,001) para las células IM-9R_{1.3} y estuvo cercana a la significación estadística para las células IM-9R_{1.5}.

Con el propósito de confirmar que la bomba extrusora de fármacos, P-gp, no solo estaba presente en las nuevas líneas celulares resistentes sino que, además, era funcionalmente activa, se determinó la acumulación intracelular de algún compuesto fluorescente que fuera sustrato de dicha bomba (Kars MD. et al, 2006), siendo rhodamina 123 la molécula más utilizada para conseguir dicho objetivo. En la **figura 4.34C** se puede observar los niveles de acumulación rhodamina 123 en los tipos celulares IM-9, IM-9R_{1.3} y IM-9R_{1.5}. Se determinó que la acumulación de rhodamina es,

aproximadamente, 16 veces menor en las células resistentes respecto a las células parentales IM-9, esta diferencia tuvo una significación estadística de $P < 0,001$ para IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5} con respecto a la línea parental.

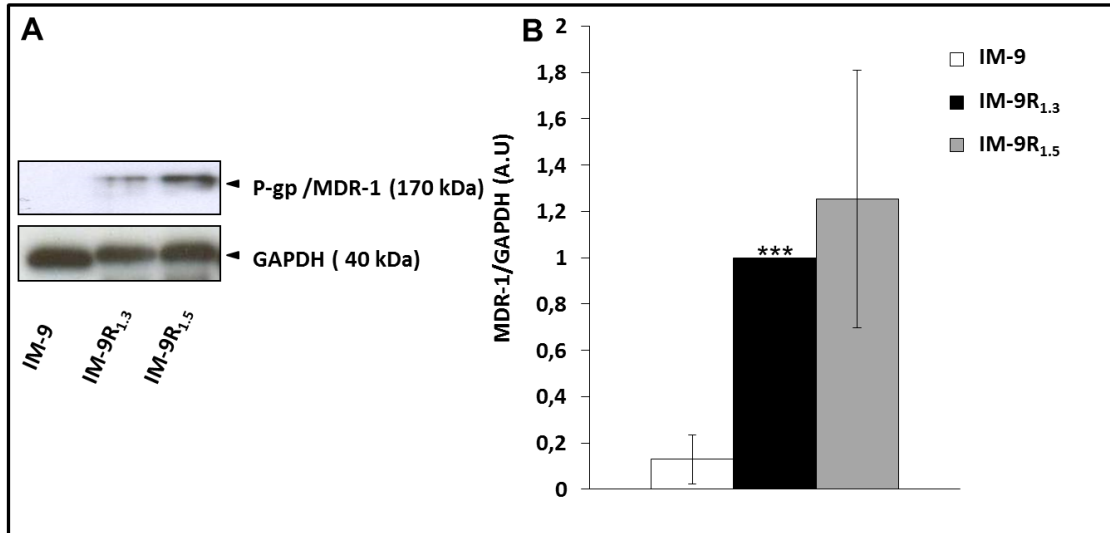


Figura 4.34. Expresión basal de MDR-1 en líneas celulares leucémicas humanas. (A) Western-blot representativo de la expresión de la proteína MDR-1 en los tipos celulares IM-9, IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5}. (B) Histogramas de barras representando los niveles de expresión de MDR-1 en las tres líneas celulares. Los valores reflejan la media de 3 experimentos \pm error típico. Los asteriscos representan los niveles de significación estadística; *** $P < 0,001$. N=3.

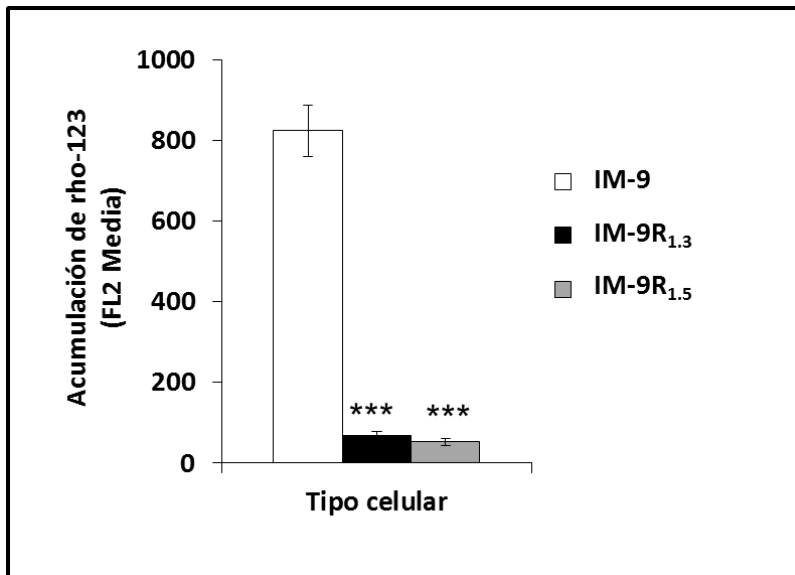


Figura 4.34C. Acumulación de rhodamina 123 en células leucémicas humana. Representación gráfica de la acumulación de rhodamina 123 en los tipos celulares IM-9, IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5} medida por citometría de flujo. Los histogramas representan la media de 3 experimentos \pm error típico de la media. Los asteriscos representan la significación estadística; *** $P < 0,001$. N=3.

En resumen, se consiguió obtener 3 sublíneas celulares resistentes a quimioterapia derivadas de la línea celular IM-9, denominadas IM-9R_{0,5}, IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5}. De estas 3 sublíneas celulares resistentes, las células IM-9R_{1,3} y IM-9R_{1,5} presentan un índice de resistencia suficiente como para considerarlas sublíneas celulares

con fenotipo MDR; además se pudo comprobar que, a diferencia de la línea celular parental IM-9, estas líneas celulares expresaban la bomba de extrusión de fármacos P-gp funcional.

9. Sensibilidad colateral al frío en células leucémicas humanas con fenotipo MDR.

Con el objetivo de observar si el proceso de sensibilidad colateral al frío era exclusivo de células leucémicas murinas con fenotipo MDR o, por el contrario, se trataba de un mecanismo general presente en células leucémicas de distintas especies y que se desencadenaba como consecuencia de la adquisición de resistencia a múltiples fármacos, se analizó la viabilidad de la línea parental IM-9 y de las nuevas sublíneas resistentes IM-9_{1,3} e IM-9_{1,5} tras cultivarlas durante 24 horas en condiciones de estrés hipotérmico.

La primera observación se realizó mediante microscopía y confirmó que las nuevas líneas celulares leucémicas humanas con fenotipo MDR presentaban sensibilidad colateral al estrés hipotérmico, al igual que habíamos observado previamente en células leucémicas murinas. En la **figura 4.35** se muestran los cultivos de las líneas celulares IM-9, IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5} incubados a 37°C y a 4°C durante 24 horas, comprobándose que la mayoría de células con fenotipo MDR mueren bajo estrés hipotérmico mientras que las células IM-9 permanecen viables en su mayoría.

En la **figura 4.36** se representan los niveles de muerte en las células parentales y en las sublíneas IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5}. Se observa que, después de 12 y 24 horas de cultivo en frío, la muerte celular es significativamente superior en células IM-9R respecto a las células parentales IM-9. Además, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en el cultivo de 24 horas de las células IM-9R_{1,3} y en los cultivos de 12 y 24 horas de las células IM-9R_{1,5}. Para comprobar si, al igual que ocurría en células murinas, el mecanismo de muerte celular a bajas temperaturas consistía en un proceso de apoptosis, se realizó un ensayo de tinción con anexina V, que marca las células que se encuentran en apoptosis temprana, y posterior análisis mediante citometría de flujo. En la **figura 4.37** se presenta el resultado de este ensayo, donde se puede comprobar como aumenta la población de células en proceso de apoptosis

temprana en los fenotipos celulares IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5} después de 24 horas de cultivo en frío, mientras que no se produjo ningún cambio en este sentido en las células IM-9.

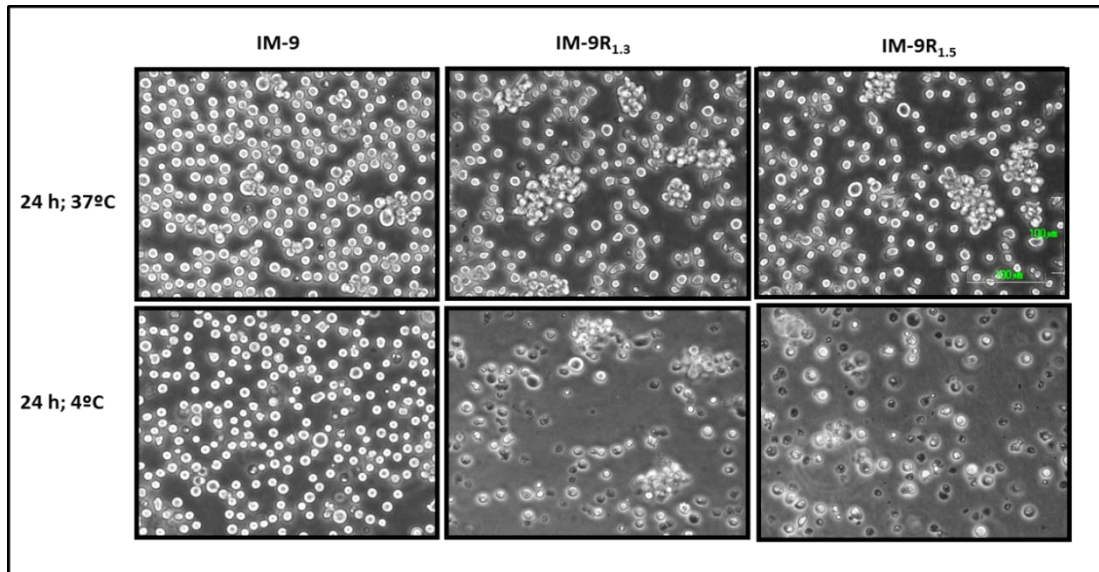


Figura 4.35. Viabilidad de células leucémicas humana incubadas a 37°C y en condiciones de estrés hipotérmico a 4°C. Fotografía de la observación a través de microscopía de la integridad celular de los tipos celulares IM-9, IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5} incubadas a 37° y 4°C durante 24 horas.

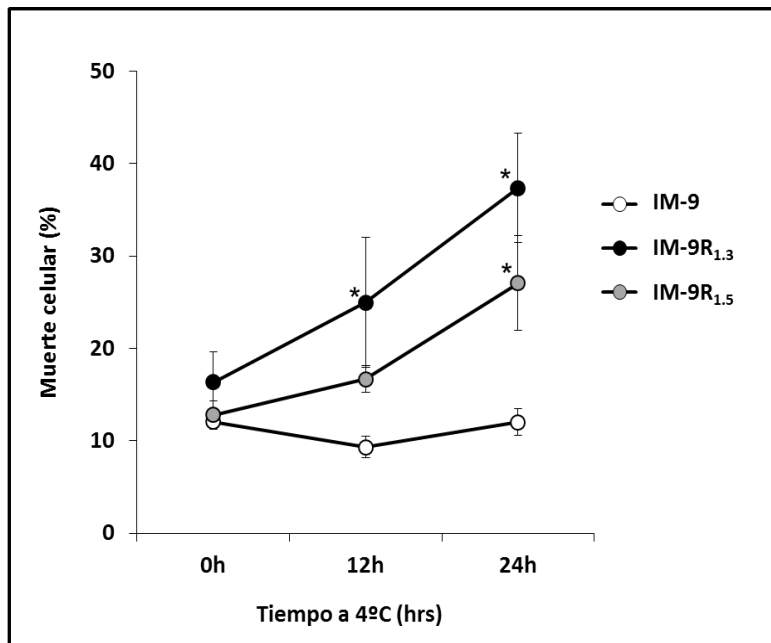


Figura 4.36. Viabilidad de células leucémicas humanas incubadas a 37°C y en condiciones de estrés hipotérmico (4°C). Representación gráfica de los porcentajes de muerte celular total en las líneas celulares IM-9, IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5} incubadas a 4°C durante 12 y 24 horas. Los puntos representan la media de 3 experimentos ± error típico de la media. Los asteriscos representan los niveles de significación estadística; * P<0,05. N=3

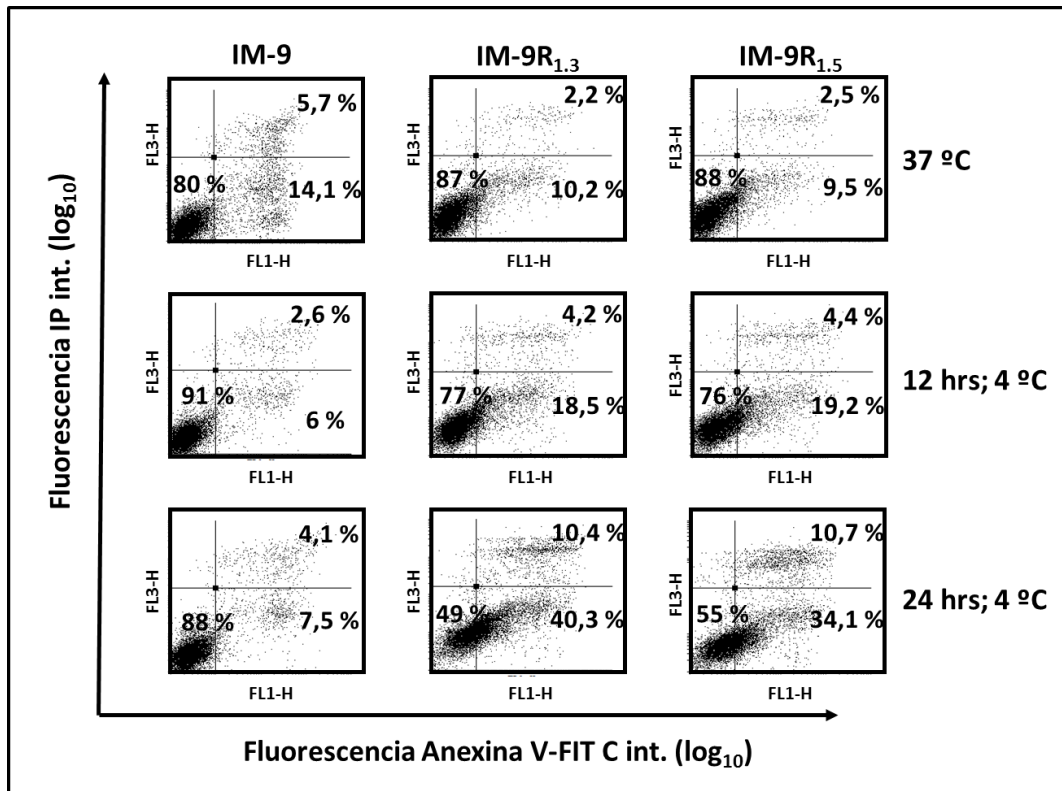


Figura 4.37. Apoptosis temprana y tardía/necrosis a 37 °C y en condiciones de estrés hipotérmico en las células IM-9, IM-9R_{1.3} e IM-9R_{1.5}. Las células se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) y los resultados se analizaron mediante citometría de flujo. Cuadro inferior izquierda: Células vivas. Cuadro inferior derecha: células en proceso de apoptosis temprana. Cuadro superior derecha: Células en proceso de apoptosis tardía y/o necrosis. En cada cuadro se muestra el porcentaje de la población comprendido en él.

10. Expresión de proteínas implicadas en supervivencia/muerte celular en las líneas celulares humanas, sensibles y resistentes a fármacos.

10.1. Expresión de caspasas activas

En primer lugar se procedió al estudio de los niveles de activación de caspasa 3 y caspasa 9 en los extractos celulares obtenidos a partir del cultivo de las líneas celulares humanas en condiciones fisiológicas mediante western-blot.

En la **figura 4.38A** se puede observar el valor medio del nivel de activación de caspasa 3 obtenido tras la realización de varios experimentos, comprobándose cómo la cantidad de los fragmentos activos de caspasa 3 es mayor en las células IM-9R_{1.3} ($P < 0,001$) y en las células IM-9R_{1.5} que en las células parentales. También se muestra en esta figura un western-blot representativo del resultado obtenido.

En la **figura 4.38B** se puede observar el resultado medio del nivel de activación de caspasa 9, comprobándose cómo la cantidad de los fragmentos activos de caspasa 9 es mayor en las células IM-9R_{1.3} y en las células IM-9R_{1.5} ($P < 0,001$ en ambos casos) comparadas con las células IM-9. También se muestra en esta figura un western-blot representativo del resultado obtenido en los experimentos.

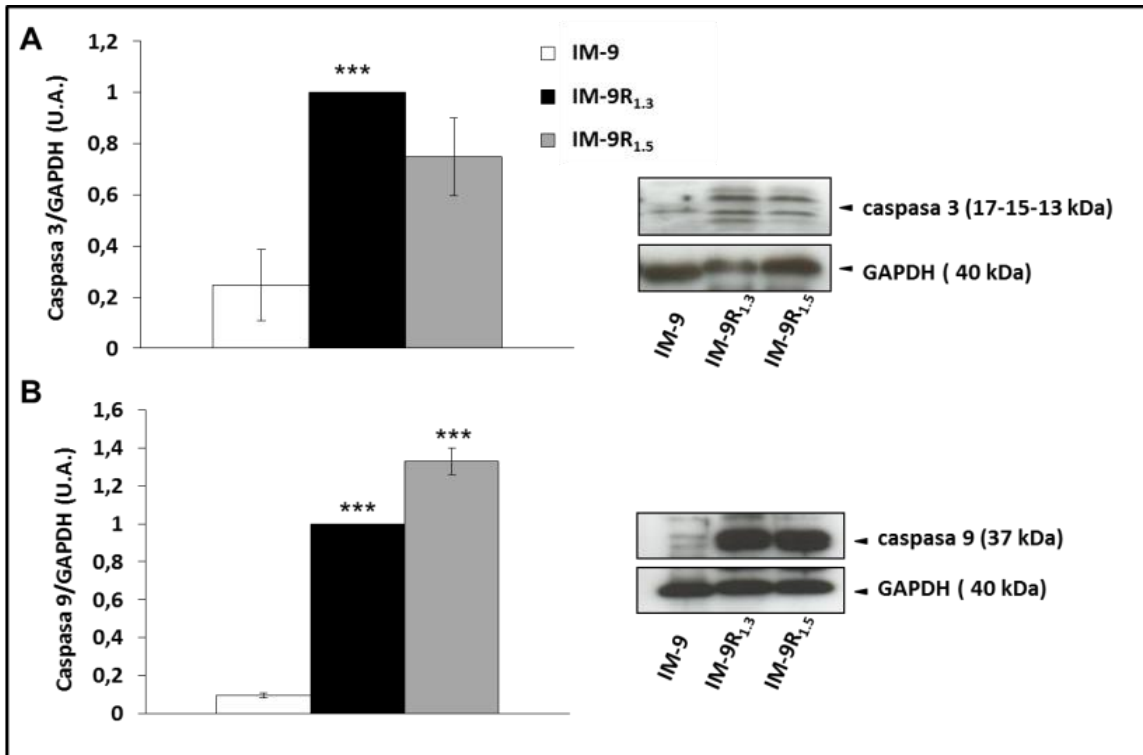


Figura 4.38. Niveles basales de expresión de caspasa 3 y caspasa 9 activas en células leucémicas humanas (IM-9, IM-9R_{1.3} e IM-9R_{1.5}). **(A)** Western-blot representativo y diagrama de barras de la expresión de los fragmentos proteolíticos activos de caspasa 3. **(B)** Western-blot representativo y diagrama de barras de la expresión de caspasa 9 activa en las líneas celulares leucémicas humanas. Los histogramas representan la media de 3 experimentos \pm error típico de la media. La normalización de la expresión de ambas proteínas se realizó tomando como referencia el nivel de expresión de la proteína en las células IM-9R_{1.3}. Los asteriscos representan los niveles de significación estadística; *** $P < 0,001$. N=3.

10.2 Expresión de proteínas de la familia Bcl-2.

Con el objetivo de estudiar la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en las líneas celulares, se realizaron análisis mediante western-blot de los extractos proteicos de las líneas leucémicas humanas IM-9, IM-9R_{1.3} e IM-9R_{1.5}. Así, se estudió la expresión de las proteínas Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 y Bax.

En la **figura 4.39A** se representa la media de los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de la proteína Bcl-xL. Mientras que en la línea parental se observó una elevada expresión de dicha proteína en los tipos celulares resistentes a quimioterapia, IM-9R_{1.3} e IM-9R_{1.5} dicha proteína estaba ausente. En ambos casos, la diferencia observada, respecto al nivel de expresión obtenido en las células IM-9, fue estadísticamente significativa ($P < 0,001$). En la **figura 4.39B** se representa el resultado obtenido para la proteína Bcl-2, encontrándose que la expresión de esta proteína se reduce a la mitad con respecto a la expresión que se encontró en las células IM-9, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,01$ para IM-9R_{1.3} y $P < 0,001$ para IM-9R_{1.5}). En la **figura 4.39C** se representa la media de los resultados obtenidos para los niveles de expresión de Mcl-1. En esta figura se puede observar cómo Mcl-1 está sobreexpresada en las células con fenotipo MDR y prácticamente no se expresa en las células sensibles a quimioterapia, siendo las diferencias encontradas, estadísticamente significativas ($P < 0,001$ para IM-9R_{1.3} y $P < 0,05$ para IM-9R_{1.5}). En esta figura también se puede observar un western-blot representativo de este resultado.

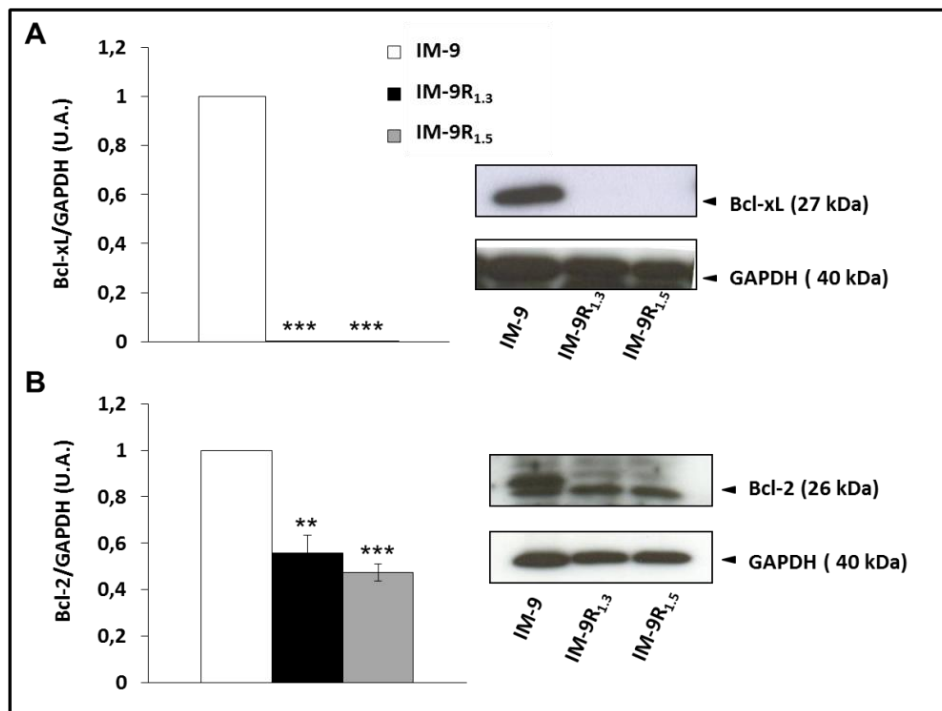


Figura 4.39. Niveles de expresión basal de proteínas de la familia Bcl-2 en las líneas celulares leucémicas humanas IM-9, IM-9R_{1.3} e IM-9R_{1.5}. Western-blot representativos y diagramas de barras mostrando la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL (**A**) y Bcl-2 (**B**). Los histogramas representan la media de 3 experimentos \pm error típico de la media. La normalización se realizó respecto al nivel de expresión en las células L1210 para Bcl-xL, Bcl-2 y Bax 21 kDa y respecto a las células L1210R R para Mcl-1 y Bax \approx 80 kDa. Los asteriscos representan la significación estadística; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. N=3.

Como proteína anti-apoptótica representativa de la familia Bcl-2 se estudió Bax, cuyos niveles de expresión se representan en la **figura 4.39D**. Tras realizar el western-blot para determinar los niveles de expresión de esta proteína, se observó que, además de la banda correspondiente al monómero de la proteína Bax (21 kDa), en nuestros ensayos también apareció una banda con peso molecular de, aproximadamente, 80 kDa reconocida por el anticuerpo específico para dicha proteína. En la figura se puede observar que la expresión de Bax prácticamente desaparece en las células con fenotipo MDR ($P < 0,001$ para IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5}) si comparamos con el nivel de expresión de esta proteína en la línea parental IM-9. En cambio, la expresión de Bax con peso molecular de 80kDa fue mayor en las células con fenotipo MDR ($P < 0,001$ para IM-9R_{1,3} y $P < 0,05$ para IM-9R_{1,5}).

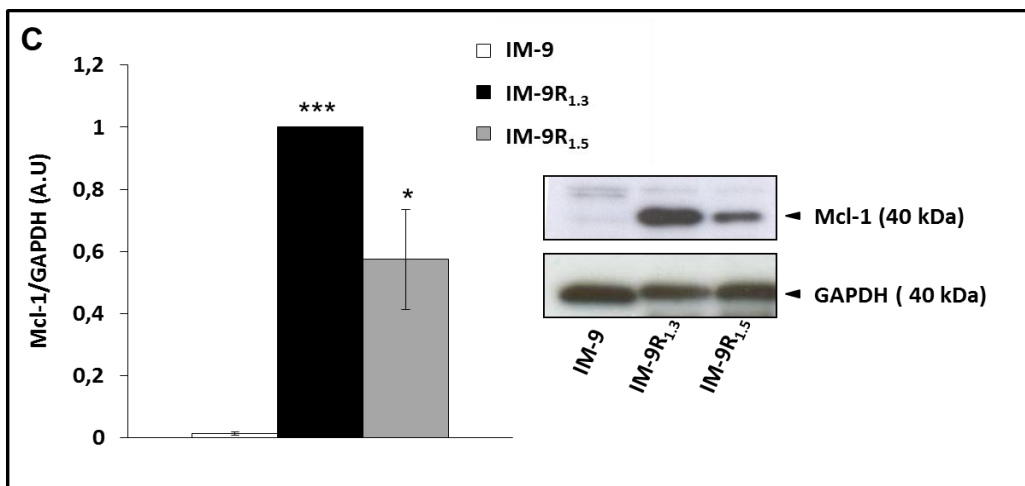
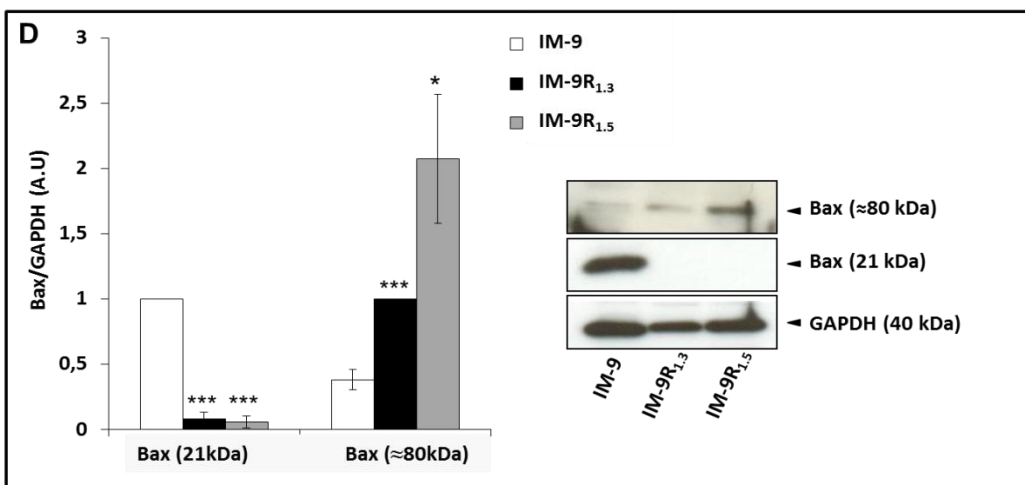


Figura 4.39 .Niveles de expresión basal de proteínas de la familia Bcl-2 en las líneas celulares leucémicas humanas IM-9, IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5}. Western-blot representativos y diagramas de barras mostrando la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 (**C**) y de la proteína pro-apoptótica Bax (**D**). Los histogramas representan la media de 3 experimentos \pm error típico de la media. Los asteriscos representan la significación estadística; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. N=3.



DISCUSIÓN

- 1. Modelo de resistencia a fármacos en células murinas y obtención de líneas celulares humanas con fenotipo MDR.**
- 2. Sensibilidad colateral a estrés hipotérmico en líneas celulares con fenotipo MDR.**
- 3. Moléculas implicadas en sensibilidad colateral por hipotermia en células con fenotipo MDR. Papel de P-gp.**
 - 3.1. Participación de caspasas en la sensibilidad colateral frente a estrés hipotérmico.**
 - 3.2. Participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la resistencia a daunomicina y en la sensibilidad colateral a estrés hipotérmico.**
 - 3.2.1. Proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y Bcl-2.**
 - 3.2.2. Proteína pro-apoptótica Bax.**
 - 3.2.3. Proteína anti-apoptótica Mcl-1.**
- 4. Rutas de señalización intracelular involucradas en sensibilidad colateral al frío en células con fenotipo MDR.**
- 5. Producción de citocinas en células con fenotipo MDR.**

1. Modelo de resistencia a fármacos en células murinas y obtención de líneas celulares humanas con fenotipo MDR.

Partimos de un modelo celular murino para el estudio de la sensibilidad colateral en células con fenotipo MDR. Dicho modelo está constituido por la línea parental L1210 y dos sublíneas resistentes a fármacos: la sublínea L1210R generada a partir de la línea parental por exposición creciente al fármaco anti-neoplásico daunomicina y la sublínea CBMC-6, generada por transfección de la línea parental con un plásmido que codifica para *Abcb1a* murina. Mientras que en la sublínea L1210R confluyen distintos mecanismos en el proceso de adquisición de resistencia a múltiples fármacos, la línea CBMC-6 permite determinar cuáles de los procesos observados en las células L1210R son debidos o están relacionados con la expresión de P-gp, tal como recomiendan Pluchino KM et al. 2012, aunque hay que tener en cuenta que la expresión de la bomba de extrusión de fármacos observada en la línea celular CBMC-6 es menor que en las células L1210R. Adicionalmente, era fundamental disponer de un modelo similar humano que permitiera determinar si los resultados obtenidos en el modelo murino eran específicos de dicho modelo celular o, por el contrario, eran extrapolables a células humanas con fenotipo MDR.

Para estudiar el fenotipo MDR en células de leucemia humanas, se obtuvieron líneas celulares resistentes mediante exposición continuada al fármaco daunomicina a partir de la línea celular sensible IM-9, que presentaba características similares a la línea celular L1210, al tratarse de una línea celular de tipo B, aunque transformada por el virus de Epstein-Barr, a partir de células procedentes de una paciente con mieloma múltiple. Tal como se ha mostrado en nuestros resultados, las líneas celulares IM-9R_{1,3} e IM-9R_{1,5} presentan un fenotipo MDR y sobreexpresan P-gp, características ambas compartidas con el modelo murino. Los índices de resistencia a DNM calculados para dichas líneas celulares superan los valores mínimos que determinan que sean consideradas propiamente como células con fenotipo MDR, al ser estos índices de resistencia superiores a 2,0 (Hall MD et al., 2009) y a 3,0 (Zhang X et al., 2010). Además de confirmar la expresión de P-gp en las sublíneas humanas resistentes a DNM, se ha confirmado la actividad extrusora de dicha bomba, al observarse expulsión de rodamina 123 (sustrato de P-gp) del interior al exterior celular (Cavalcanti GB Jr et al., 2004). Por otra parte, también se ha observado una mayor agregación celular en los

cultivos de dichas células resistentes, siendo esta una característica que suele producirse en las células con fenotipo MDR, debido a la expresión diferencial de integrinas. Además, la adhesión celular permite prevenir la muerte celular a través de diversos mecanismos (Shain KH y Dalton WS, 2001).

2. Sensibilidad colateral a estrés hipotérmico en líneas celulares con fenotipo MDR.

La sensibilidad colateral (CS) se refiere a un proceso mediante el cual, la adquisición del fenotipo MDR en células cancerosas va frecuentemente acompañado por alteraciones moleculares que podrían hacer que dichas células fueran más susceptibles a otros agentes distintos a los responsables de la inducción de resistencia. Estas alteraciones moleculares varían dependiendo de la línea celular y del fármaco utilizado en el proceso de quimioterapia de una forma que no es siempre predecible (Hall et al., 2009) y representarían un “talón de Aquiles” en las células con fenotipo MDR (Pluchino KM et al., 2012).

Los resultados expuestos demuestran, por primera vez, la existencia de sensibilidad colateral frente a un estímulo inductor de estrés como es la hipotermia, en células leucémicas murinas con fenotipo MDR que sobreexpresan P-gp (L1210R y CBMC-6). Además, y lo que es más importante, hemos encontrado que la sensibilidad colateral al frío no es un proceso exclusivo de nuestro modelo celular murino, sino que también se produce en líneas celulares linfoblásticas humanas con fenotipo MDR (IM-9R_{1.3} e IM-9R_{1.5}) que sobreexpresan P-gp. Estos datos sugieren que la sensibilidad colateral al frío podría ser un proceso general característico de la adquisición de fenotipo MDR en distintas especies. Se deberían realizar estudios adicionales para determinar si puede afectar a distintos tipos de células (no sólo a células leucémicas de tipo B) y para determinar si está únicamente asociada a la expresión de P-gp o también a otros mecanismos de adquisición de resistencia.

La importancia del proceso de sensibilidad colateral a estrés hipotérmico en células de leucemia murina y humana con fenotipo MDR no se basa sólo en las nuevas posibilidades terapéuticas que ofrece, sino también en su potencial uso como una herramienta para estudiar las alteraciones que tienen lugar en las células MDR y

entender mejor la complejidad del proceso de resistencia a múltiples fármacos, que, finalmente, también contribuirá a encontrar o desarrollar compuestos nuevos que mimeticen el efecto del estrés hipotérmico.

La observación de nuestros resultados apoya los resultados obtenidos por otros autores, que han sugerido un papel protagonista para P-gp en el destino celular (Hall MD et al., 2009, Ruefli A et al, 2000). En este sentido, demostramos que la transfección de la línea parental (L1210) con un plásmido que contiene el gen murino *Mdr1a* (*Abcb1a*, *P-gp1a*) es suficiente para inducir hipersensibilidad al frío en estas células (CBMC-6), lo que demuestra la importante implicación de P-gp en el proceso de sensibilidad colateral.

Se han propuesto diversas hipótesis que intentan explicar la sensibilidad colateral en células con fenotipo MDR que sobreexpresan P-gp (Pluchino KM et al., 2012). Dichas hipótesis son:

1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de una sobreutilización de las reservas energéticas de ATP.
2. Incremento de la sensibilidad a alteraciones del balance energético.
3. Extrusión de sustratos endógenos importantes para la supervivencia celular.
4. Alteración de la membrana citoplasmática.

En el caso de la muerte celular producida por estrés hipotérmico podrían participar diversos mecanismos. Así, la bajada de la temperatura daría lugar a un aumento del gasto energético que sería más costoso para las células MDR que para las parentales, puesto que las células resistentes tienen un gasto energético basal superior al de las células de las que proceden (Hall MD et al., 2009). Dicho gasto energético provocaría un aumento del número de radicales libres de oxígenos (ROS) en las células quimiorresistentes, por encima de los niveles aceptables para la supervivencia celular, que provocaría un daño celular mayor en dichas células. Otra posibilidad es que las células MDR tengan una menor cantidad de glutatión que las haría más susceptibles ante una situación de estrés celular. Finalmente, podría ocurrir que el cambio de viscosidad de la membrana celular que se produce ante un cambio en la temperatura (Tait AS et al., 2013) pudiera afectar a la funcionalidad de P-gp. Otra hipótesis distinta y complementaria a las expuestas es la que sugieren los resultados presentados en esta

tesis, según la cual, P-gp actuaría controlando o interfiriendo con las rutas de inducción de apoptosis mediadas por caspasas, por lo que la supervivencia de las células resistentes en distintas condiciones, estaría íntimamente relacionada con la funcionalidad de la bomba extrusora de fármacos.

3. Moléculas implicadas en sensibilidad colateral por hipotermia en células con fenotipo MDR. Papel de P-gp.

Tal como se ha descrito en la introducción, las principales vías de inducción de apoptosis discurren a través de rutas mediadas por las enzimas denominadas “caspasas”, siendo caspasa 3 la enzima donde confluyen las principales vías de inducción de apoptosis. Otras proteínas importantes en la regulación de estas rutas son los miembros de la familia Bcl-2, tanto los anti-apoptóticos como los pro-apoptóticos. Finalmente, existen una serie de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que, en última instancia, pueden bloquear la activación de las rutas de apoptosis.

3.1.Participación de caspasas en la sensibilidad colateral frente a estrés hipotérmico.

Algunas observaciones apoyan la posibilidad de que P-gp promueva la supervivencia celular a través de rutas independientes de su función extrusora, incluyendo la inhibición de apoptosis dependiente de caspasas (Johnston et al., 1999; Ruefli et al., 2000, 2002ab) o la reducción de los niveles de ceramida (Mizutani et al., 2008). De hecho, se ha descrito que P-gp protege las células MDR de la apoptosis inhibiendo caspasa 8 y caspasa 3; así, se ha publicado que las células que expresan P-gp son capaces de resistir la muerte celular inducida por exposición a rayos ultravioleta (UV) y a señalización a través de receptores de muerte como Fas y TNFR (Johnstone et al., 1999; Ruefli et al., 2000, 2000ab; Martín-Orozco E et al., 2005). No obstante, la inhibición de apoptosis dependiente de caspasa 3 se ha descrito como dependiente de la línea celular y del estímulo apoptótico utilizado; por ejemplo, algunos estímulos, como el tratamiento con curcumina o radiación UV, inducen apoptosis dependiente de caspasa 3 en células MDR HL-60 que sobreexpresan P-gp (Bielak-Zmijewska A et al., 2004; Turella P et al., 2006).

En nuestro modelo de células leucémicas de ratón (L1210R y CBMC-6), la adquisición del fenotipo MDR está asociada con altos niveles de actividad caspasa 3 sin que dichos niveles afecten la viabilidad celular. Lo mismo ocurre en nuestro modelo de células leucémicas humanas con fenotipo MDR (IM-9R), observándose además en dichas líneas celulares una alta expresión del fragmento activo de caspasa 9. En este sentido, nuestros resultados también apoyan los obtenidos por otros autores que han descrito que las células MDR con sobreexpresión de P-gp presentan una protección frente a la muerte celular mediada por caspasa 3 (Johnstone et al., 1999; Ruefli et al., 2000, 2002ab). Sorprendentemente, a pesar del papel protector de P-gp a temperatura fisiológica (37°C), nuestros resultados muestran la existencia de hipersensibilidad de las células MDR murinas (L1210R, CBMC-6) a bajas temperaturas, a través de un mecanismo dependiente de caspasa 3 como lo demuestra la reversión de dicha muerte celular cuando utilizamos inhibidores de caspasas (**figuras 4.9 A y B**).

Estas observaciones sugieren que el papel protector de P-gp es dependiente de la temperatura (Wartenberg M et al., 2005; Callaghan R et al., 2008). De hecho, aunque nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de P-gp en las células MDR murinas incubadas a bajas temperaturas, probablemente como resultado de un mecanismo general de respuesta frente al estrés (Seo SB et al., 2010), también se observa una pérdida de la funcionalidad de dicha bomba, como lo demuestra el incremento sostenido de acumulación de rhodamina 123 en las células murinas que expresan P-gp, cuando se incuban a 4°C, lo cual es indicativo de una pérdida de la actividad extrusora de dicha proteína.

El papel directo de P-gp como controlador de la actividad caspasa 3 no se ha podido confirmar definitivamente, puesto que con los ensayos de silenciamiento con oligonucleótidos siARN específicos para P-gp se obtuvo un silenciamiento parcial de la proteína que no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia celular (células L1210R y CBMC-6) (**figuras 4.12 y 4.13**), ni sobre la actividad caspasa 3 (**figura 4.14**) o la resistencia a daunomicina (**figuras 4.15 y 4.16**) (aunque en este caso sí que se observa un aumento de la sensibilidad con las dosis más altas). La ausencia de diferencias significativas en células L1210R podría deberse también a la alta muerte celular obtenida en todos los casos tras la electroporación, que podría enmascarar los resultados. En este sentido, algunos autores han descrito que en células con fenotipo MDR, se producen alteraciones en la composición y propiedades de las membranas

celulares que contribuyen al desarrollo de sensibilidad colateral (Callaghan R y Riordan JR, 1995). Más allá de esta primera observación, Alemán C et al. (2003) describió que estos cambios en las propiedades biofísicas de la membrana celular son independientes de la expresión de P-gp, ya que al transfectar una línea celular con un plásmido codificante de P-gp no observaron alteraciones en la membrana celular. Nuestros resultados con células CBMC-6 apoyan este último estudio.

Teniendo en cuenta la diversidad de factores intrínsecos implicados en la regulación de rutas de apoptosis en diferentes células tumorales, no podemos excluir la posibilidad de que pueda haber otros factores, además de la expresión de P-gp, que bloqueen la actividad enzimática de caspasa 3. En este sentido, Campone M et al. (2001) han demostrado que células HL-60 que expresaban P-gp son resistentes a la apoptosis dependiente de caspasa 3 debido a la presencia de XIAP, que pertenece a la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), que actúa inhibiendo caspasa 3 mediante la unión a su prodominio y previniendo así la activación de procaspasa 3. Adicionalmente, en la actualidad no se puede descartar que la inducción de la expresión de P-gp pueda tener otros efectos sobre rutas celulares metabólicas claves, que podrían influir en la sensibilidad celular ante agentes inductores de apoptosis.

A la vista de estos descubrimientos, se puede especular que, como una consecuencia del tratamiento farmacológico, varios clones de células L1210 evolucionan hacia una alta expresión de P-gp (fenotipo resistente MDR), que actúa no sólo expulsando fármacos del interior celular, sino también controlando el incremento de la actividad caspasa 3 producido como consecuencia de la exposición al fármaco. Bajo estrés hipotérmico, la actividad extrusora de P-gp se inactiva y, como consecuencia de ello, dicha proteína deja de ejercer un control sobre la actividad caspasa 3 que, de esta manera, es capaz de inducir muerte celular. En consecuencia, una estrategia usada por las células MDR para sobrevivir en presencia de un fármaco podría ser el control a través de P-gp, de forma directa o indirecta, de los altos niveles de moléculas pro-apoptóticas (caspasa 3) inducidos por el tratamiento farmacológico. La bomba extrusora, o las proteínas asociadas a ella, actuarían controlando el balance de proteínas pro-apoptótica/anti-apoptóticas a temperatura fisiológica, pero no a bajas temperaturas.

Adicionalmente, la sobreexpresión de un mutante de la actividad ATPasa de P-gp ha demostrado que aunque las células que expresaban dicha forma mutante de P-gp no

podían expulsar fármacos quimioterapéuticos, sí eran capaces de mantener una cierta resistencia al proceso de apoptosis. De estos resultados se deduce que P-gp podría inhibir apoptosis mediante una actividad dual, que involucraría la extrusión de fármacos dependiente de su actividad ATPasa y la inhibición de apoptosis independiente de la actividad ATPasa (Tainton KM et al., 2004). Sin embargo, estos descubrimientos han sido cuestionados por otros autores que han observado que las células con altos niveles de P-gp son, paradójicamente, más sensibles a algunos agentes inductores de apoptosis, actuando a través de la ruta mitocondrial (vía intrínseca) o a través de la muerte mediada por receptores de la membrana (vía extrínseca) (Matarrese P et al., 2001; Cenni V et al., 2004). Nuestros resultados demuestran la existencia de una fuerte asociación entre la pérdida de la funcionalidad extrusora de P-gp y la muerte celular a bajas temperaturas, aunque se deberían llevar a cabo estudios adicionales para determinar si la inducción de muerte celular por hipotermia es dependiente o independiente de ATP.

Por otro lado, el efecto de los inhibidores de caspasas sobre la muerte celular observada en las células L1210R y CBMC-6 sometidas a estrés hipotérmico, es similar en todos ellos (**figura 4.9B**), lo que impide saber la contribución exacta de cada caspasa al proceso de apoptosis. Este hecho, junto con la observación de la activación basal de caspasa 3 en las células L1210R y CBMC-6, podría indicar que la muerte por estrés hipotérmico se debe a una elevada activación de caspasa 3 y que cualquier inhibidor que disminuya la activación de dicha molécula (ya sea de forma directa o indirecta a través de la inhibición de otras caspasas activadoras de caspasa 3) actuaría revirtiendo la muerte celular de manera considerable.

3.2 Participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la resistencia a daunomicina y en la sensibilidad colateral a estrés hipotérmico.

Los resultados expuestos en esta tesis, basados en los previamente presentados en la tesina de D. Miriam Lencina Guardiola (2011), demuestran que, en nuestro modelo de leucemia murina, la adquisición del fenotipo MDR se asocia no sólo con la sobreexpresión de P-gp, sino también con cambios en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-xL y Bcl-2) que modifican la contribución individual de estas proteínas a la supervivencia de las células. Además, los resultados obtenidos en el

modelo de células de leucemia humana con fenotipo MDR apoyan la observación inicial realizada en células murinas, poniendo de manifiesto no sólo que se puedan producir cambios en la expresión de Bcl-xL y Bcl-2 como consecuencia del desarrollo del fenotipo MDR, sino que, además, se pueden producir cambios en la expresión de las proteínas Mcl-1 y Bax.

En este sentido, se ha publicado que la sobreexpresión de varios miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 en cánceres hematológicos, se asocia con la resistencia a fármacos (Bugginsa AGS et al., 2010). Algunos autores como Campone M et al. (2001) y Simstein R et al. (2003) han observado diferencias drásticas en el perfil de expresión de Bcl-2 después de la adquisición del fenotipo MDR en células cancerosas. En este sentido, en las líneas celulares resistentes humanas desarrolladas en nuestro laboratorio (IM-9R) hemos observado la desaparición de Bcl-xL, una disminución de Bcl-2 y un incremento de Mcl-1 respecto a la expresión de estas proteínas anti-apoptóticas en la línea parental sensible IM-9. Respecto a las proteínas anti-apoptóticas, hemos observado la ausencia de la proteína anti-apoptótica Bax en las células humanas resistentes a fármacos.

3.2.1. Proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y Bcl-2

Teniendo en cuenta, tanto los resultados expuestos en la tesina de Doña Miriam Lencina, como los expuestos en esta tesis, hemos observado, en nuestro modelo celular murino, que la inducción del fenotipo resistente a fármacos lleva asociados cambios importantes en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2, de manera que, mientras que las células parentales presentan alta expresión de Bcl-xL y muy baja de Bcl-2, en las células L1210R se produce una disminución en la expresión de Bcl-xL y un drástico aumento en la expresión de Bcl-2. Estos cambios parecen ser independientes de la expresión de P-gp, ya que las células transfectadas con P-gp (CBMC-6) mantienen niveles de expresión de dichas proteínas de la familia Bcl-2 prácticamente idénticos a los de la línea parental L1210.

Para comprobar la contribución de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL a la viabilidad de las células sensibles y resistentes a fármacos en condiciones

fisiológicas y de estrés celular (hipotérmico y por tratamiento farmacológico), así como su relación con la expresión de P-gp, se realizaron silenciamientos de estas proteínas en las líneas celulares murinas y, además, se cuantificó la expresión de estas proteínas al silenciar P-gp. Así, en la línea celular parental (L1210) y en la línea transfectada con P-gp (CBMC-6), la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL se correlaciona con un papel fundamental para esta proteína en ambas líneas celulares, debido a que el silenciamiento con siARNs específicos induce un incremento significativo de la muerte celular en condiciones fisiológicas. La disminución de la expresión de Bcl-xL en la línea celular L1210R, se correlaciona con la pérdida del papel de esta proteína en la supervivencia celular. Las células L1210R, además, experimentan un incremento significativo de la expresión de la proteína Bcl-2 aunque, sorprendentemente, el silenciamiento de esta proteína no afecta a la viabilidad celular. Sin embargo, esta carencia de efecto puede explicarse por diferentes motivos, uno podría ser el efecto de la inhibición parcial de la expresión de la proteína Bcl-2 (aproximadamente del 55% en las tres líneas celulares) con el siARN, que evitaría observar un efecto significativo en la viabilidad de las células. Este porcentaje de silenciamiento es similar al obtenido con el siARN específico para Bcl-xL, sin embargo, en este segundo caso el silenciamiento parcial de la proteína fue suficiente para inducir una disminución drástica de la supervivencia de las células afectadas. Así, parece que el papel de Bcl-2 en la supervivencia de las células L1210R es menos evidente que el papel de Bcl-xL en la supervivencia de las células L1210 y CBMC-6. Una segunda posibilidad está basada en la alta muerte basal observada en las células L1210R tras la técnica de electroporación, que podría enmascarar el incremento de muerte celular debido al silenciamiento de Bcl-2. Sin embargo, también se produce una alta muerte basal en condiciones de estrés hipotérmico y, aun así, se puede observar un aumento significativo de la muerte celular en las células en las que se ha silenciado Bcl-xL. Finalmente, una explicación más plausible es que la supervivencia de las células MDR podría depender de varias proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-xL y Bcl-2) y otras familias (como IAPs). Esta estrategia permitiría a las células resistentes permanecer más protegidas contra la muerte celular en caso de exposición a fármacos. Sin embargo, se deberían realizar experimentos adicionales para discriminar entre las diferentes posibilidades.

En relación con las observaciones expuestas, otros autores han encontrado cambios en la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 en distintos

modelos celulares y se han relacionado con la adquisición del fenotipo MDR (Kutuk O and Letai A, 2008; Kunzei D et al., 2008; Ajabnoor GMA et al., 2012; Tahir SK et al., 2007). En este sentido, el análisis de 60 líneas celulares tumorales demostró una fuerte correlación entre el nivel de expresión de Bcl-2 y la resistencia a agentes quimioterápicos (Kang MH y Reynolds P, 2009; Adams JM y Cory S, 2007). Además, se ha descrito que las células HL60, sin expresión de P-gp y con expresión de Bcl-2 y Bax, cuando se cultivan en presencia de dosis subletales de doxorubicina, se transforman en células con fenotipo resistente (dox:HL-60/Dox), expresando en este caso P-gp y donde la expresión de Bcl-2 se reemplaza por Bcl-xL, mientras que no se observan cambios en la expresión de la proteína Bax (Campone M et al., 2001). Otros estudios comparativos entre células sensibles y resistentes demostraron que las células resistentes expresaban un patrón distinto de miembros de la familia Bcl-2 en comparación con su línea parental sensible, reforzando la asociación entre expresión de bombas de extrusión de fármacos y la expresión de miembros de la familia Bcl-2. Además, se ha descrito que, en células MCF-7, los fármacos quimioterapéuticos actúan, en parte, regulando la expresión de algunos miembros de la familia Bcl-2. Así, paclitaxol y tiotepa inducen un incremento de algunas proteínas pro-apoptóticas y una disminución de otras anti-apoptóticas. Resultados similares se han descrito frente a un tratamiento con doxorubicina, que induce una disminución de la expresión de Bcl-2 y un incremento de la expresión de Bax (Simstein R et al., 2003). Teniendo en cuenta todas estas observaciones, es posible sugerir que el incremento de los niveles de expresión de Bcl-2 observados en nuestro modelo celular de leucemia murina con fenotipo MDR (L1201R) podría ser debido a la selección de clones con sobreexpresión de P-gp y Bcl-2 al mismo tiempo, puesto que tal combinación favorecería la supervivencia de estas células en presencia del fármaco daunomicina. Esta hipótesis explicaría el intercambio de la expresión de Bcl-xL a Bcl-2 en las células con fenotipo MDR inducido por tratamiento farmacológico. Sin embargo, nuestros resultados con el silenciamiento de Bcl-2 no muestran cambios significativos en la muerte celular después del tratamiento con daunomicina o en la acumulación de rhodamina, probablemente debidos a diversos mecanismos, como el hecho de que la expresión de la bomba de extrusión de fármacos P-gp participa en el fenotipo de resistencia y podría enmascarar la contribución individual de la proteína Bcl-2 en el fenotipo de resistencia a fármacos.

Ya que la expresión diferencial de miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 en células sensibles y resistentes forma parte de los cambios en las rutas apoptóticas de las células MDR y, como hemos observado que Bcl-xL es una proteína clave para la viabilidad de las células sensibles y transfectadas con P-gp, decidimos analizar el papel individual de Bcl-xL y Bcl-2 en la protección frente a dos tipos de estrés como la exposición al fármaco daunomicina y la incubación a 4°C. Así, el silenciamiento de Bcl-xL tuvo un efecto drástico sobre la viabilidad de las células L1210 y CBMC-6 en condiciones fisiológicas, como ya hemos descrito, aunque, sin embargo, la exposición de estas células a ambos tipos de estrés indujo un incremento de la muerte celular similar en células silenciadas para Bcl-xL y células control. En las células L1210R tampoco hemos encontrado una asociación entre el silenciamiento de proteínas anti-apoptóticas y la disminución de la viabilidad celular en condiciones de estrés. Estos resultados apoyan la idea de que, la viabilidad de las células L1210R en condiciones de estrés, podría venir determinada por una interrelación compleja entre los miembros de la familia proteica Bcl-2 (así como moléculas anti-apoptóticas de otras familias) que pueden promover o prevenir la apoptosis.

Nuestros resultados sugieren papeles complementarios de las dos proteínas anti-apoptóticas estudiadas (Bcl-xL y Bcl-2) ya que muestran un perfil diferente de expresión y una contribución diferente a la supervivencia de las células resistentes y sensibles. En este sentido, los estudios genómicos demuestran la existencia de diferentes funciones *in vivo* entre los miembros de la familia Bcl-2 debidas, probablemente, a su expresión relativa en diferentes tipos celulares o tejidos (Youle RJ et al., 2008). Así, Bcl-2 es necesaria para la supervivencia de linfocitos maduros, células madre melanocíticas y las células del riñón durante el desarrollo, Bcl-w para las células de Sertoli en los testículos, y A1 en neutrófilos. Estudios realizados con ratones quimera y *knockout* han demostrado que Bcl-2 es necesaria para la supervivencia de los precursores hematopoyéticos y para linfocitos B y T, mientras que Bcl-xL es necesaria para la supervivencia de eritrocitos maduros. Además, se ha descrito que las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL ejercen diferentes papeles relacionados con la inhibición de la muerte celular. Así, la sobreexpresión de Bcl-2 en algunos tipos celulares puede inhibir la muerte celular por apoptosis y por mecanismos no apoptóticos, participando en la parada del ciclo celular en la fase G1, promoviendo la senescencia celular (Kim R, 2005; Youle RJ y Strasser A, 2008).

Se han publicado numerosos estudios sugiriendo la existencia de una asociación entre las bombas de extrusión de fármacos (como P-gp), la expresión de los miembros de la familia Bcl-2 y las rutas de apoptosis (Fantappiè O et al., 2007; Campone M et al., 2001). Nuestros resultados con las células transfectadas con P-gp (CBMC-6) muestran que no hay una asociación entre la expresión de P-gp y Bcl-2, ya que las células parentales transfectadas con P-gp no muestran modificaciones en el perfil de expresión de los miembros de la familia Bcl-2 analizados en este estudio. Estos resultados apoyan los obtenidos por otros autores (Kim DW et al., 2009) que describen que, tras el silenciamiento de algunos genes anti-apoptóticos (Bcl-xL, Bcl-2, XIAP) no se producen cambios en la cantidad de ARNm y expresión proteica de la glicoproteína P comparado con las células no silenciadas. Adicionalmente, silenciando el gen que codifica para P-gp no se producen cambios en la expresión de ninguna proteína anti-apoptótica. Estos datos y los presentados en esta tesis sugieren que el perfil de proteínas anti-apoptóticas y la expresión de P-gp son procesos independientes de resistencia en células leucémicas.

En cuanto a los resultados obtenidos en las nuevas líneas celulares humanas MDR, se encontró que la adquisición del fenotipo MDR conlleva una pérdida de la expresión de Bcl-xL (como en el modelo murino) y, además, una disminución de la expresión de Bcl-2. En los análisis de western-blot de la proteína Bcl-2 resultó interesante la aparición de dos bandas en las células parentales IM-9, siendo la banda superior exclusiva de estas células sensibles y apareciendo la banda inferior en las células sensibles y resistentes. La banda superior podría corresponder a una forma fosforilada de Bcl-2 que desaparece completamente después de la adquisición del fenotipo MDR. En relación a este hecho, algunas investigaciones apoyan la hipótesis de que la fosforilación de Bcl-2 suprime su actividad anti-apoptótica; sin embargo, otras investigaciones argumentan que la fosforilación de Bcl-2 en el residuo serina 70 promueve su actividad anti-apoptótica. Desafortunadamente, esta discrepancia continúa actualmente (Kanamaru Y et al., 2012). Otra explicación para las dos bandas encontradas de la proteína Bcl-2 se sugiere a partir de los resultados publicados por Del Bello B et al. (2001), que observaron que, ante un estímulo de estrés oxidativo en células de melanoma con resistencia a fármacos, la proteína Bcl-2 puede romperse a través de las actividades de caspasa 3 y caspasa 7 en un fragmento de 23kDa que tendría funciones similares a Bax, convirtiéndose así en una proteína pro-apoptótica. Aunque para poder dilucidar a qué proceso corresponde realmente esta banda proteica en nuestro

modelo celular se deberían realizar más experimentos utilizando un anticuerpo específico que reconozca la proteína Bcl-2 fosforilada y/o comprobar si desaparece la banda más pequeña al utilizar un inhibidor de las actividades caspasa 3 y 7; aunque parece más plausible la hipótesis de la fosforilación de Bcl-2 ya que esta banda superior también se encuentra en las células parentales IM-9, en las que no se observan niveles apreciables de caspasa 3 activa.

3.2.2. Proteína pro-apoptótica Bax.

En nuestro modelo de células murinas, no hemos encontrado diferencias en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax entre células sensibles y resistentes. Sin embargo, en las células resistentes humanas hemos observado que el monómero de Bax desaparece en las células resistentes, pero, en paralelo, aparece una banda de 80-90 kDa en dichas células. Esta banda podría corresponder a una forma oligomérica de Bax que ha sido previamente descrita por otros autores (Gogada R et al., 2011), indicando la importancia de la oligomerización de Bax en la liberación mitocondrial de citocromo c, que desencadena la activación de caspasa 9 y caspasa 3. Estos hechos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestras células resistentes humanas, en las que hemos observado altos niveles de las formas activas de caspasas 9 y caspasa 3.

Hemos estudiado la contribución de la proteína pro-apoptótica Bax a la viabilidad celular en el modelo murino en condiciones fisiológicas y de estrés celular (exposición al fármaco DNM o a bajas temperaturas). Sin embargo, no hemos observado diferencias en la viabilidad celular después del silenciamiento de Bax entre las células murinas sensibles o resistentes cultivadas en condiciones fisiológicas o en condiciones de estrés. En relación a esto, se ha descrito un papel redundante de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak. Así, se ha observado que ratones en los que la expresión de la proteína Bax había sido silenciada, eran propensos a desarrollar tumores (Knudson CM et al., 2001) y, sin embargo, en otros estudios, para el desarrollo de tumores epiteliales era necesaria la pérdida de las proteínas anti-apoptóticas Bax y Bak (Degenhardt K et al., 2002). Además, se ha demostrado que el papel de Bax como supresor de tumores podría ser diferente dependiendo del tipo celular. Así, la pérdida de Bax incrementaría el desarrollo de tumores cerebrales inducidos por el antígeno SV40-T

(Yin C et al., 1997) y el de linfomas inducidos por Myc (Eischen CM et al., 2001), mientras que la pérdida de un alelo incrementaría el desarrollo de tumores mamarios (Cartron PF et al., 2003). En resumen, como regla general, mientras que la pérdida de una única proteína anti-apoptótica (Bax o Bak) tiene un efecto limitado en la inducción de apoptosis en muchos tipos celulares, la deficiencia de ambas proteínas causa letalidad perinatal en ratones y provoca una alta resistencia a la sobreexpresión de proteínas de la subfamilia con un único dominio BH3, así como la inducción de un amplio rango de estímulos apoptóticos, desencadenando la ruta intrínseca de muerte celular (Labi V et al., 2008).

3.2.3. Proteína anti-apoptótica Mcl-1

En nuestro modelo de células leucémicas humanas resistentes, se observa una sobreexpresión de Mcl-1 en comparación con su línea parental sensible, en la que esta proteína no se expresa. De acuerdo con esta observación, se ha publicado la existencia de un efecto aditivo en el silenciamiento conjunto de Mcl-1 y P-gp en células que sobreexpresan P-gp que demostró un incremento en la dependencia de Mcl-1 para la supervivencia celular. También se ha descrito un aumento del efecto citotóxico de doxorubicina tras el silenciamiento de la proteína Mcl-1 (Aliabadi HM et al., 2013). Otros autores muestran que la sobreexpresión de Mcl-1 en ratones, los predispone a la aparición de linfomas de células B de desarrollo tardío y que la expresión de Mcl-1 está asociada con un pronóstico negativo y con la aparición de resistencia en una gran variedad de tumores humanos, particularmente en mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y melanoma (Campbell KJ et al., 2010). Mientras que las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL se asocian con Bax para inhibir su actividad pro-apoptótica, la existencia de una asociación Bak-Mcl-1 en células sanas sugiere que Mcl-1 puede neutralizar la actividad pro-apoptótica de Bak mediante la formación de un complejo proteico inactivo (Cuconati A et al., 2003). Finalmente, se ha demostrado que, la presencia de un estímulo apoptótico como el daño en el ADN provocado por la radiación UV o la activación de oncogenes, causa la eliminación de Mcl-1 marcándolo para su degradación por el proteasoma, liberando de este modo a Bak y promoviendo la apoptosis (Cuconati A et al., 2003; Nijhawan D et al., 2003). La restauración completa de Mcl-1 bloquea la respuesta apoptótica frente a

un daño en el ADN, demostrando que la eliminación de Mcl-1 es esencial para el proceso de muerte celular en esta ruta (Gélinas C y White E, 2005; Gillissen B et al., 2010).

En resumen, las células que muestran el fenotipo MDR son más resistentes a algunos agentes antineoplásicos comparadas con las células parentales sensibles de las que proceden. Este fenómeno puede ligarse a una asociación entre las bombas de extrusión de fármacos (como P-gp), el perfil de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 y las rutas de inducción de apoptosis. Así, nuestros estudios y los de otros autores muestran que las células leucémicas MDR tienen un perfil distinto de expresión de los miembros de la familia Bcl-2 comparado con el perfil mostrado por las células parentales. Estas diferencias afectan, especialmente, a la sobreexpresión de miembros anti-apoptóticos de esta familia (Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1) y, como consecuencia, se producen cambios en los requerimientos para la supervivencia en las líneas celulares sensibles y resistentes a fármacos. La contribución individual de los miembros anti-apoptóticos a la supervivencia celular bajo condiciones fisiológicas o bajo estrés y su influencia en el control de la ruta de apoptosis dependiente de la mitocondria (vía intrínseca) permitirá descubrir dianas moleculares que contribuirán al diseño de terapias más efectivas para el tratamiento de leucemias.

4. Rutas de señalización intracelular involucradas en sensibilidad colateral al frío en células con fenotipo MDR.

Adicionalmente, procedimos a la identificación y estudio de moléculas señalizadoras que participan en rutas intracelulares implicadas en la supervivencia celular y que pudieran resultar alteradas en el proceso de adquisición del fenotipo MDR. Así, nos centramos en la ruta de las MAPKs y PI3K/Akt y analizamos la activación de algunas de las moléculas que participan en dichas rutas, así como su implicación en la supervivencia celular en condiciones fisiológicas y de estrés hipotérmico.

Respecto a las MAPKs, hemos observado una regulación diferente de la activación de JNK y ERK en las células resistentes comparadas con las células sensibles en condiciones de estrés hipotérmico. Por el contrario, no hemos observado diferencias significativas entre las tres líneas celulares en cuanto a la activación de la proteína p38

en condiciones de estrés hipotérmico. Confirmando los resultados anteriores, hemos encontrado que estas moléculas (ERK y JNK) juegan un papel importante en la supervivencia de las células L1210R y CBMC-6 a bajas temperaturas puesto que el uso de inhibidores específicos de dichas moléculas revierte parcialmente el proceso de sensibilidad colateral al frío.

ERK ha sido descrita como la ruta de señalización de MAPKs que se asocia con los procesos de crecimiento celular, proliferación y supervivencia (Ballif BA and Blenis J, 2001; Rubinfeld H y Seger R, 2005). Estos datos coinciden con lo observado en nuestro modelo celular murino, en el que la activación de ERK se mantiene estable en condiciones de estrés hipotérmico en las células L1210 y disminuye rápidamente en las células L1210R, hecho que se mantiene a tiempos largos de exposición al frío (12 y 24horas, datos no mostrados) y que precede al inicio del proceso de apoptosis. Por su parte, la sublínea CBMC-6 presenta un comportamiento intermedio al de las otras dos líneas celulares. Este comportamiento diferencial de la activación de ERK en células MDR incubadas a bajas temperaturas apoyaría la hipótesis de que la inducción de muerte celular en dichas condiciones podría ser debida a una inactivación parcial de la ruta de ERK mediada por caspasas (Widmann C et al., 1998).

La importancia de ERK1/2 en la muerte celular se demostró utilizando un inhibidor de MEK1/2 en cultivos de las tres líneas celulares (L1210, L1210R y CBMC-6) en condiciones de estrés hipotérmico. En dichas condiciones, se produjo un rescate significativo de la muerte celular inducida por el estrés hipotérmico en las dos líneas celulares con fenotipo MDR (L1210R 20% y CBMC-6 22%). En este sentido, se ha demostrado la participación de la ruta de MEK1/2-ERK1/2 en la inducción de apoptosis a través de diferentes compuestos citotóxicos (Calcabrini A et al., 2006). Un hecho paradójico, es que nuestros resultados muestran una asociación entre la disminución de activación de ERK y la inducción de apoptosis en células con fenotipo MDR y, sin embargo, al inhibir esta activación se rescata una gran parte de la población celular del proceso de muerte. Una posible explicación puede ser la existencia de rutas compensatorias del efecto de ERK sobre la supervivencia celular, que podrían estimularse con la utilización de un inhibidor farmacológico. En este sentido, en nuestros resultados hemos observado que la inhibición de ERK induce una disminución, aunque no significativa de la activación de p38 en las células L1210R y CBMC-6

(**figura 4.29**), lo que podría disminuir la señal de muerte celular mediada por esta ruta. Finalmente, también se podría atribuir el desencadenamiento de la muerte celular a la existencia de diferencias en el perfil de activación de ERK entre las células sensibles y las resistentes bajo condiciones de estrés hipotérmico, que podría ser determinante sobre la actividad pro- o anti-apoptótica de esta molécula. En este sentido, diversos investigadores han descrito que la duración y la intensidad de la activación de MAPKs es determinante para el destino celular, es decir, crecimiento frente a apoptosis (Ebisuya M et al., 2005; Yu WP et al., 2001).

En consonancia con los resultados observados en la activación de la ruta de ERK, la ruta de JNK muestra un comportamiento similar a la anterior en varios aspectos, observándose un nivel de activación basal significativamente más elevado en las células L1210 y CBMC-6 que en las células L1210R. En condiciones de estrés hipotérmico se observó un aumento significativo de la fosforilación de JNK (activación) en la línea parental, mientras que en las sublíneas resistentes (L1210R y CBMC-6) dichos niveles de activación bajaron o se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo de incubación a bajas temperaturas. Solamente se observó un aumento en la fosforilación de JNK en la línea celular L1210R tras 8 horas de incubación a 4°C. Dichos resultados concuerdan con las observaciones de otros autores que describen a JNK como represora de la expresión de la proteína MDR-1 en condiciones fisiológicas (Kang CD et al., 2000, Miao ZH y Ding J, 2003; Zhou J et al., 2006). En cambio, se ha observado que en condiciones de estrés, como hipoxia, la expresión del gen *MDR-1* se activa mediante una respuesta mediada por la activación JNK a través del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF1) (Liu M et al., 2007; Comerford KM et al., 2002; Wartenberg M et al., 2003), hecho que es coincidente con nuestras observaciones en las células L1210R en las que se produce un aumento de la fosforilación de JNK a las 8 horas de exposición a estrés hipotérmico (**figura 4.24**), que coincide con un aumento de la expresión de MDR-1 (**figura 4.10**), por lo que podemos suponer la existencia de un comportamiento dual de la ruta de JNK en nuestras células resistentes L1210R. En condiciones basales se mantendría una baja actividad de JNK que sería compatible con la expresión de la proteína MDR-1 y, en condiciones de estrés, la activación de JNK incrementaría la expresión de dicha proteína. En este último caso, el aumento de expresión de MDR-1 podría conllevar un mayor gasto energético para la célula, que podría suponer un lastre para su supervivencia.

La importancia de la activación de la ruta de JNK sobre la supervivencia celular en homeostasis descrita por Juntilla MR et al (2008) se puede observar en nuestro modelo celular murino, en el que la inhibición de dicha ruta a 37°C induce la muerte celular en los tres tipos celulares, siendo mayor este aumento en la línea celular L1210R. En contraste con estos resultados, la inhibición de la ruta de JNK en condiciones de estrés hipotérmico induce una reversión de la muerte celular de 25-30%, en las líneas celulares murinas MDR (L1210R y CBMC-6). Este efecto podría deberse bien a la actuación de esta ruta de señalización bajo condiciones de estrés sobre la expresión/actividad de MDR-1 o bien a través de su actuación sobre las rutas de inducción de apoptosis, concretamente disminuyendo los niveles de caspasa 3 activa en dichas células. En este sentido, se ha descrito que JNK fosforilada activa la apoptosis mediada por caspasas (Juntilla MR et al., 2008), por lo que la inhibición de esta ruta disminuiría la señal de apoptosis mediada por estas moléculas. Esta última opción parece la más probable en nuestro modelo celular L1210R, puesto que no hemos observado cambio alguno en la expresión de MDR-1 al utilizar el inhibidor de la ruta de JNK SP600125 (figura 4.22), aunque para confirmar este punto queda pendiente la realización de experimentos que determinen el efecto de los inhibidores sobre la funcionalidad de MDR-1 y sobre los niveles de caspasa 3 activa.

Es interesante destacar los resultados obtenidos con la línea celular CBMC-6 en lo que respecta al perfil de activación de JNK en condiciones fisiológicas y de estrés hipotérmico., Dichos resultados sugieren que la expresión de P-gp, por sí sola no afecta al nivel de activación de la ruta de JNK en condiciones basales, en cambio sí afecta a su comportamiento bajo condiciones de estrés, provocando que no se active como en la línea celular parental L1210 y que siga un comportamiento parecido, en esta situación, al de la línea celular con fenotipo MDR (L1210R).

Teniendo en cuenta todas las observaciones realizadas sobre la activación de la ruta de JNK se puede especular que, en las células con fenotipo MDR cultivadas en condiciones de estrés hipotérmico, la ruta de JNK y la expresión de MDR-1 están interrelacionadas y dicha conexión funciona en ambos sentidos: P-gp actuaría disminuyendo la capacidad de activación de JNK y JNK actuaría sobre la actividad anti-apoptótica de P-gp.

Nuestros resultados muestran que JNK y ERK cooperan en la regulación de la viabilidad celular a bajas temperaturas en células murinas con fenotipo MDR (L1210R y CBMC6). Este efecto parcialmente aditivo sugiere que ambas moléculas podrían actuar sobre rutas de apoptosis en las células MDR. En realidad, ambas quinasas han sido descritas como moduladoras de la expresión y/o fosforilación de miembros de la familia Bcl-2 (Fan M et al., 2000; Zhou F et al., 2011) implicados en las rutas de inducción de apoptosis. Sin embargo, esta hipótesis necesita estudiarse en profundidad.

En cuanto a la activación de la ruta de p38, no se ha observado un comportamiento significativamente diferente en ninguno de los tres tipos celulares murinos, tanto en condiciones de cultivo fisiológicas como bajo estrés hipotérmico. Además, tampoco se ha observado que la inhibición de esta ruta tenga efecto alguno sobre la supervivencia celular. A pesar de ello, el hecho de que varios autores hayan observado una estrecha interconexión entre las tres rutas de MAPKs en la regulación de la supervivencia celular (Juntilla MR et al., 2008; Widmann C et al., 1998; Suzuki K et al., 2001) hace que no se pueda descartar p38 como una molécula importante en nuestro modelo celular, pudiendo tener un efecto indirecto en la viabilidad a través de su interrelación con las rutas de ERK y JNK en condiciones de estrés hipotérmico, interrelación mediada, bien a través de fosfatasa de ERK1/2 Y MEK1/2 (Li SP et al., 2003; Westermarck J et al., 2001; Liu Q y Hofmann PA, 2004) o por la activación de caspasas que pueden inhibir la señalización a través de ERK actuando sobre Raf-1 y MEK1/2 (Widmann C et al., 1998; Suzuki K et al., 2001).

Una característica diferencial de la señalización intracelular mediada por MAPKs en las células con fenotipo MDR murinas estudiadas, respecto a su línea parental sensible a quimioterapia, es la comunicación entre las distintas rutas de señalización. Así, nuestros datos preliminares sugieren que los niveles de p-ERK tienden a aumentar al inhibir las rutas de p38 y JNK en las células L1210 y CBMC-6, mientras que en las células L1210R, los niveles de activación de ERK sólo aumentan cuando se inhibe JNK pero no cuando se inhibe p38. Este efecto podría deberse a la capacidad de p38 y JNK para disminuir la activación de ERK mediada por caspasas o fosfatasa de MEK1/2 y ERK1/2 (Juntilla JM et al., 2008). Con p38 y JNK también se observan diferencias entre los tipos celulares estudiados en lo que respecta a la comunicación entre rutas intracelulares, sin embargo los resultados no están tan claros

como los de la molécula ERK. En cualquier caso, aunque estos datos son muy prometedores, hay que interpretarlos con mucha precaución, dado que se trata de resultados preliminares.

En cuanto a la ruta señalizadora de PI3K/Akt, su inhibición provocó un aumento leve de la muerte celular a 37°C en las células L1210 y un aumento mucho mayor en las células L1210R, poniendo de manifiesto que las células con el fenotipo MDR inducido por exposición al fármaco daunomicina son más dependientes de la ruta de PI3K/Akt para su supervivencia en condiciones fisiológicas que las otras dos líneas celulares. Probablemente, este hecho se basa en que ante la inhibición de esta ruta, el efecto es mayor en las células L1210R donde los niveles basales de caspasa 3 activa son elevados y donde el balance de proteínas de la familia Bcl-2 está alterado.

5. Producción de citocinas en células con fenotipo MDR.

Se conoce poco sobre la producción y secreción de citocinas en tumores con fenotipo MDR. De hecho sigue siendo un punto controvertido determinar si los transportadores ABC están o no involucrados en la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Entre los resultados preliminares presentados en esta tesis, destacó la secreción de IL-1 α en el sobrenadante de cultivo de las células murinas MDR y no en la línea parental, en condiciones de estrés hipotérmico. Este resultado podría ser debido a que dicha citocina fuera sustrato de P-gp, ya que las bombas de extrusión de fármacos pueden expulsar del interior celular moléculas de pequeño tamaño molecular. Otra posibilidad, contemplada por algunos autores es que los transportadores excretaran sustratos de relevancia fisiológica que influyeran, de manera secundaria, sobre la producción y secreción de ciertas citocinas por parte de las células MDR (van de Ven R et al., 2009; Kooij G et al., 2009).

En cuanto a la producción de citocinas en células murinas tratadas con DNM, cabe destacar la drástica disminución en la producción de TNF α intracelular en células L1210 y no en células MDR (sobre todo en la línea celular L1210R), en las cuales la producción de dicha citocina sigue siendo muy elevada. La disminución de la producción de TNF- α está correlacionada con la muerte celular que se produce en la

línea parental en presencia de DNM. El significado de este resultado, no está claro puesto que hay autores que describen efectos opuestos de TNF- α sobre la expresión de P-gp y la quimiorresistencia (Reuter S et al., 2010; Fernandez C et al., 2010; Sukhai M et al., 2000).

Los resultados presentados en esta tesis abren vías muy prometedoras en la profundización de los mecanismos y moléculas que contribuyen a la aparición del fenotipo MDR y podrían contribuir, en el futuro, a la identificación de nuevas dianas terapéuticas que permitieran el diseño de tratamientos más efectivos para eliminar células leucémicas quimiorresistentes.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis son las siguientes:

1. La sensibilidad colateral a estrés hipotérmico es un proceso asociado a la adquisición de fenotipo MDR en células leucémicas murinas y humanas.
2. El mecanismo de muerte celular que se produce en células leucémicas murinas como consecuencia de la sensibilidad colateral a estrés hipotérmico consiste en un proceso de apoptosis dependiente de caspasas.
3. La sensibilidad colateral a estrés hipotérmico en células leucémicas murinas con fenotipo MDR está asociado con la expresión y funcionalidad de P-gp en dichas células.
4. El proceso de adquisición de fenotipo MDR en células leucémicas murinas y humanas va acompañado de cambios drásticos en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2. Sin embargo, no se ha podido demostrar asociación entre dichas proteínas y el proceso de sensibilidad colateral a estrés hipotérmico.
5. Las vías de señalización intracelulares de ERK1/2 y JNK1/2/3 están implicadas en el proceso de sensibilidad colateral a estrés hipotérmico observado en células murinas con fenotipo MDR.
6. La señalización a través de citocinas podría ser un factor importante en la respuesta de las células con fenotipo MDR ante distintas situaciones de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

Adams JM, Cory S. “Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential”. *Curr Opin Immunol* 19(5):488-96. Octubre 2007.

Ajabnoor GMA, Crook T, Coley HM. “Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells”. *Cell Death and Disease* 3, e260. 2012.

Alemán C, Annereau JP, Liang XJ, Cardarelli CO, Taylor B, Yin JJ, Aszalos A, Gottesman MM. “P-glycoprotein, expressed in multidrug resistant cells, is not responsible for alterations in membrane fluidity or membrane potential”. *Cancer Res* 63(12):3084-91. Junio 2003.

Alexander-Miller MA, Derby MA, Sarin A, Henkart PA, Berzofsky JA. “Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bc1-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes”. *J Exp Med* 188(8):1391-1399. 1998.

Aliabadi HM, Mahdipoor P y Uludağ H. “Polymeric delivery of siRNA for dual silencing of Mcl-1 and P-glycoprotein and apoptosis induction in drug-resistant breast cancer cells”. *Cancer Gene Therapy* 20:169-177. Marzo 2013.

Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G. “Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding”. *Science* 323(5922):1718-22. Marzo 2009.

Altenberg GA, Vanoye CG, Han ES, Deitmer JW, Reuss L. “Relationships between Rhodamine 123 Transport, Cell Volume, and Ion-channel Function of P-glycoprotein”. *Am Soc Biochem and Mol Biol* 269(10):7145-49. Marzo 1994.

Ballif BA, Blenis J. “Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals”. *Cell Growth Differ* 12(8):397-408. Agosto 2001.

Barcelo F, Barcelo I, Gavilanes F, Ferragut JA, Yanovich S, Gonzalez-Ros JM. “Interaction of anthracyclines with nucleotides and related compounds studied by spectroscopy”. *Biochim Biophys Acta*. Vol 884 (1), p 172-181. Octubre 1986.

Bark H, Choi C-H. “PSC833, cyclosporine analogue, downregulates MDR1 expression by activating JNK/c-Jun/AP-1 and suppressing NF- κ B”. *Cancer Chemother Pharmacol* (65):1131–1136. 2010.

Baumgart A, Seidl S, Vlachou P, Michel L, Mitova N, Schatz N, Specht K, Koch I, Schuster T, Grundler R, Kremer M, Fend F, Siveke JT, Peschel C, Duyster J, Dechow T. “ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer”. *Cancer Res* 70:5368–5378. 2010.

Bentley J, Bell SE, Quinn DM, Kellett GL, Warr JR. “2-deoxy-D-glucose toxicity and transport in human multidrug-resistant KB carcinoma cell lines”. *Oncol Res* 8(2):77-84. 1996.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction”. *Biotechnology Annual Review* 11: 127-152. 2005.

Bielak-Mijewska A, Piwocka K, Magalska A, Sikora E. “P-glycoprotein expression does not change the apoptotic pathway induced by curcumin in HL-60 cells”. *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2):179-85. Febrero 2004.

Bradford MM. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal Biochem* 72:248-54. Mayo 1976.

Brüning A, Rahmeh M, Inglemaier A, Friese K. “The mitochondria-independent cytotoxic effect of nelfinavir on leukemia cells can be enhanced by sorafenib-mediated mcl-1 downregulation and mitochondrial membrane destabilization”. *Mol Cancer* 9:19. 2010.

Bugginsa AGS, Pepper CJ. “The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia”. *Leukemia Research* 34:837–842. 2010.

Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V, López-Abente G. “Cancer mortality trends in Spain 1980-2007”. *Annals of Oncology* 21 (Supplement 3): iii14-iii-20, 2010.

Calcabrini A, García-Martínez JM, González L, Tendero MJ, Ortuño MT, Crateri P, Lopez-Rivas A, Arancia G, González-Porqué P, Martín-Pérez J. “Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human breast cancer cells by lauryl gallate”. *Carcinogenesis* 27:1699-712. 2006.

Callaghan R, Crowley E, Potter S, Kerr ID. “P-glycoprotein: So Many Ways to Turn It On”. *J Clin Pharmacol* 48:365-378. 2008.

Callaghan R, Riordan JR. “Collateral sensitivity of multidrug resistant cells to narcotic analgesics is due to effects on the plasma membrane”. *Biochim Biophys Acta* 1236(1):155-62. Mayo 1995.

Campbell KJ, Bath ML, Turner ML, Vandenberg CJ, Bouillet P, Metcalf D, Scott CL, Cory S. “Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance”. *Blood* 116(17):3197-3207. Octubre 2010.

Campono M, Vavasseur F, Le Cabellec MT, Meflah K, Vallette FM, Oliver L. “Induction of chemoresistance in HL-60 cells concomitantly causes a resistance to apoptosis and the synthesis of P-glycoprotein”. *Leukemia* 15:1377-1387. Septiembre 2001.

Cano-Gauci DF, Riordan JR. “Collateral Sensitivity of Multidrug-Resistant Cells”. *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells (part 5)* 337-47. Plenum Press (Roninson I.B.,ed). 1991.

Cartron PF, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K, Vallette FM. “Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis”. *Mol Cell Biol* 23(13):4701-12. 2003.

Castro-Galache MD, Ferragut JA, Barbera VM, Martín-Orozco E, Gonzalez-Ros JM, García-Morales P, Saceda M. “Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors”. *Int J Cancer* 104(5):579-86. Mayo 2003.

Cavalcanti GB Jr, Vasconcelos FC, Pinto de FARIA g, Scheiner MA, de Almeida Dobbin J, Klumb CE, Maia RC. “Coexpression of p53 protein and MDR functional phenotype in leukemias: the predominant association in chronic myeloid leukemia”. *Cytometry B Clin Cytom* 61(1):1-8. Septiembre 2004.

Cenni V, Maraldi NM, Ruggeri A, Secchiero P, Del Coco R, De Pol A, Cocco L, Marmioli S. “Sensitization of multidrug resistant human osteosarcoma cells to Apo2 Ligand/TRAIL-induced apoptosis by inhibition of the Akt/PKB kinase”. *Int J Oncol* 25(6):1599-608. Diciembre 2004.

Cerezo D, Lencina M, Ruiz-Alcaraz AJ, Ferragut JA, Saceda M, Sanchez M, Cánovas M, García-Peñarrubia P, Martín-Orozco E. “Acquisition of MDR phenotype by leukemic cells is associated with increased caspase-3 activity and a collateral sensitivity to cold stress”. *J Cell Biochem* vol 113(4), p 1416-25. Abril 2012.

Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM. “Self-association of daunomycin”. *Biochemistry*, vol. 21, p 3927-32. Agosto 1982.

Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. “Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis”. *Cell Death Differ* (11):915-923. 2004.

Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. “Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene”. *Cancer Res* 62(12):3387-94. Junio 2002.

Covelli A. “Modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies”. *Annals of Oncology*, 10(6):S53-S59. 1999.

Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. “The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product”. *Science* vol 258(5081):478-80. Octubre 1992.

Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. “DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells”. *Genes & Dev* 17: 2922–2932. Diciembre 2003.

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. “SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1”. *FEBS Lett* 364(2):229-33. Mayo 1995.

Deeley RG, Cole SP. “Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1)”. *FEBS Lett* 358(4):1103-11. Febrero 2006.

Degenhardt K, Chen G, Lindsten T, White E. “BAX and BAK mediate p53-independent suppression of Tumorigenesis”. *Cancer Cell* 2:193-203. 2002.

Del Bello B, Valentini MA, Zunino F, Comporti M, Maellaro E. “Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells”. *Oncogene* 20(33):4591-5. Julio 2001.

Ding S, Chamberlain M, McLaren A, Goh L, Duncan I, Wolf CR. “Cross-talk between signalling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1”. *Br J Cancer* 85(8):1175-84. Octubre 2001.

Doi K, Li R, Sung SS, Wu H, Liu Y, Manieri W, Krishnegowda G, Awwad A, Dewey A, Liu X, Amin S, Cheng C, Qin Y, Schonbrunn E, Daughdrill G, Loughran TP Jr, Sebti S, Wang HG. “Discovery of Marinopyrrole A (Maritoclax) as a Selective Mcl-1 Antagonist that Overcomes ABT-737 Resistance by Binding to and Targeting Mcl-1 for Proteasomal Degradation”. *The Journal of Biological Chemistry* 287(13):10224–10235. Marzo 2012.

Domina AM, Smith JH, Craig RW. “Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition”. *J Biol Chem* 275(28):21688–21694. 2000.

Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Radere M, Haberl I, Andreeff M, Huber H. “Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4 and interferon-gamma in normal human T lymphocytes”. *Blood* 88(5):1747-54. Septiembre 1996.

Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. “The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity”. *J Cell Sci* 118:2997-3002. Julio 2005.

Eischen CM, Roussel MF, Korsmeyer SJ, Cleveland JL. “Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis”. *Mol Cell Biol* 21(22):7653-62. Noviembre 2001.

Fan M, Goodwin M, Vu T, Brantley-Finley C, Gaarde WA, Chambers TC. “Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade”. *J Biol Chem* 275(39):29980-5. Septiembre 2000.

Fantappiè O, Solazzo M, Lasagna N, Platini F, Tessitore L, Mazzanti R. “P-Glycoprotein Mediates Celecoxib-Induced Apoptosis in Multiple Drug-Resistant Cell Lines”. *Cancer Res* 67:4915-4923. Mayo 2007.

Fernandez C, Buyse M, German-Fattal M, Gimenez F. “Influence of the proinflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality”. *J Pharm Pharmaceut Sci* 7(3):359-371. 2004.

Ferte J. “Analysis of the tangled relationships between Pglycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane”. *Eur J Biochem* 267:277-94. 2000.

Frank MH, Denton MD, Alexander SI, Khoury SJ, Sayegh MH, Briscoe DM. “Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro”. *J Immunol* 166(4):22451-9. Febrero 2001.

Gélinas C, White E. “BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis”. *Genes & Dev* 19:1263-1268. 2005.

Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, Mürer A, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B, Daniel PT. “Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma”. *J Cell Biol* 188(6):851-62. Marzo 2010.

Ginguené C, Champier J, Maallem S, Strazielle N, Jouvét A, Fèvre-Montange M, Gherzi-Egea JF. “P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) localize in the microvessels forming the blood-tumor barrier in ependymomas”. *Brain Pathol* 20(5):926-35. Septiembre 2010.

Gogada R, Prabhu V, Amadori M, Scott R, Hashmi S, Chandra D. “Resveratrol induces p53-independent, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated Bax protein oligomerization on mitochondria to initiate cytochrome c release and caspase activation”. *J Biol Chem* 286(33):28749-28760. Agosto 2011.

Gollapud S, Gupta S. “Anti-P-glycoprotein antibody-induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of P-glycoprotein in lymphocyte survival”. *J Clin Immunol* 21(6):420-30. Noviembre 2001.

Grabinski N, Bartkowiak K, Grupp K, Brandt B, Pantel K, Jücker M. “Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells”. *Cell Signal* 23(12):1952-60. Diciembre 2011.

Groesdonk HV, Florian Wagner, Beatrix Hoffarth, Michael Georgieff, Uwe Senftleben. “Enhancement of NF- κ B Activation in Lymphocytes Prevents T Cell Apoptosis and Improves Survival in Murine Sepsis”. *J. Immunol* 8083-8089. 2007.

Grogan TM, Spier CM, Salmon SE, Matzner M, Rybski J, Weinstein RS, Scheper RJ, Dalton WS. “P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: correlation with prior chemotherapy”. *Blood* 81(2):490-5. Enero 1993.

Hall MD, Handley MD, Gottesman MM. “Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity”. *Trends Pharmacol Sci* 30(10):546-56. Octubre 2009.

Hobbs RP, Amargo EV, Somasundaram A, Simpson CL, Prakriya M, Denning MF, Green KJ. “The calcium ATPase SERCA2 regulates desmoplakin dynamics and intercellular adhesive strength through modulation of PKCa signaling”. *FASEB J* 25:990–1001. 2011.

Hung CC, Liou HH. “YC-1, a novel potential anticancer agent, inhibit multidrug-resistant protein via cGMP-dependent pathway”. *Invest New Drugs* 29(6):1337-46. Diciembre 2011.

Johnstone R.W., Cretney E., Smyth M.J. “P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death”. *Blood*, 93:1075-1085.

Juntilla MR, Li SP, Westermarck J. “Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival”. *FASEB J* 22(4):954-65. Abril 2008.

Kanamaru Y, Sekine S, Ichijo H, Takeda K. “The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses”. *J Signal Transduct Epub* 2012:931215. Julio 2012.

Kang CD, Ahn BK, Jeong CS, Kim KW, Lee HJ, Yoo SD, Chung BS, Kim SH. “Downregulation of JNK/SAPK activity is associated with the cross-resistance to P-glycoprotein-unrelated drugs in multidrug-resistant FM3A/M cells overexpressing P-glycoprotein”. *Exp Cell Res* 256(1):300-7. Abril 2000.

Kang MH y Reynolds P. “Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy”. *Clin Cancer Res* 15(4):1126-1132. 2009.

Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. “Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein”. *Mol Cancer Ther* (6):2092-2102. 2007.

Kavitha K, Vidya Priyadarsini R, Anitha P, Ramalingam K, Sakthivel R, Purushothaman G, Singh AK, Karunagaran D, Nagini S. “Nimbolide, a neem limonoid abrogates canonical NF κ B and Wnt signaling to induce caspase-dependent apoptosis in human hepatocarcinoma (HepG2) cells”. *Eur. J. Pharmacol.* 681: 6-14. Abril 2012.

Kim DW, Kim KO, Shin MJ, Ha JH, Seo SW, Yang J, Lee FY. “siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells”. *Mol Cancer* 8:28. Mayo 2009.

Kim R. “Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333(2):336–343. Julio 2005.

Kleinow KM, Johnston BD, Holmes EP, McCarrol ME. “Rhodamine 123 permeability through the catfish intestinal wall: Relationship to thermal acclimation and acute temperature change”. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144(3):205-15. Noviembre 2006.

Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ. “Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice”. *Cancer Res* 61(2):659-65. Enero 2001.

Kooij G, Backer R, Koning JJ, Reijerkerk A, van Horsen J, van der Pol SM, Drexhage J, Schinkel A, Dijkstra CD, den Haan JM, Geijtenbeek TB, de Vries HE. “P-glycoprotein acts as an immunomodulator during neuroinflammation”. *PLoS One* 4(12):e8212. Diciembre 2009.

Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. “Pyridinylimidazole compound SB203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase”. *Biochem Biophys Res Commun* 263(3):825-31. Octubre 1999.

Kunzei D, Wuttig D, Fuessel S, Kraemer K, Kotzsch M, Meye A, Grimm MO, Hakenverg OW, Wirth MP. “siRNA Inhibition of Antiapoptotic Genes (XIAP, BCL2, BCL-XL) in Bladder Cancer Cells”. *Anticancer research* 28:2259-2264. 2008.

Kutuk O, Letai A. “Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737”. *Cancer Research* 68(19): 7985-7994. 2008.

Laberge RM, Ambadipudi R, Georges E. “P-glycoprotein (ABCB1) modulates collateral sensitivity of a multidrug resistant cell line to verapamil”. *Arch Biochem Biophys* 491(1-2):53-60. Noviembre 2009.

Labi V, Grespi F, Baumgartner F, Villunger A. “Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy?”. *Cell Death Differentiation*, 15:977-987. Junio 2008.

Laemmli UK. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature* 227: 680-85. 1970.

Lamacchia C, Rodriguez E, Palmer G, Vesin C, Seemayer CA, Rubbia-Brandt L, Gabay C. “Mice deficient in hepatocyte-specific IL-1Ra show delayed resolution of concanavalin A-induced hepatitis”. *Eur J Immunol* 42(5):1294-303. Mayo 2012.

Lamkanfi M, Dixit VM. “Manipulation of host cell death pathways during microbial infections”. *Cell Host Microbe* 8(1):44-54. Julio 2010.

Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. “Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice”. *Science* 289(5488):2350-4. Septiembre 2000.

Legrand O, Perrot JY, Simonin G, Baudard M, Marie JP. “JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia”. *Blood* 97(2):502-8. Enero 2001.

Li SP, Junttila MR, Han J, Kähäri VM, Westermarck J. “p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2”. *Cancer Res* 63(13):3473-7. Julio 2003.

Liu M, Li D, Aneja R, Joshi HC, Xie S, Zhang C, Zhou J. “PO(2)-dependent differential regulation of multidrug resistance 1 gene expression by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway”. *J Biol Chem* 282(24):17581-6. Junio 2007.

Liu Q, Hofmann PA. “Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes”. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(6):H2204-12. Junio 2004.

Luqmani YA. “Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy”. *Med Princ Pract* 14 Suppl 1:35-48. 2005.

Machín RP, Rodríguez-Díaz Y, Vega-Hernández MC. “La ruta mTOR como diana terapéutica”. *Biocancer* 3. Epub 2006.

Mantovani I, Cappellini A, Tazzari PL, Papa V, Cocco L, Martelli AM. “Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells”. *J Cell Physiol* 207(3):836-44. Junio 2006.

Martin-Orozco E, Ferragut JA, García-Peñarrubia P, Ferrer-Montiel A. “Acquisition of multidrug resistance by L1210 leukemia cells decreases their tumorigenicity and enhances their susceptibility to the host immune response”. *Cancer Immunol Immunother* 54(4):328-36. Abril 2005.

Mason BL, Pariente CM, Thomas SA. “Changes in the Brain Accumulation of Glucocorticoids in abcb1a-Deficient CF-1 Mice”. *Journal of Neuroendocrinology* 24, 1440–1446. 2012.

Matarrese P, Testa U, Cauda R, Vella S, Gambardella L, Malorni W. “Expression of P-170 glycoprotein sensitizes lymphoblastoid CEM cells to mitochondria-mediated apoptosis”. *Biochem J* 355(Pt 3):587-95. Mayo 2001.

McCollum AK, TenEyck CJ, Stensgard B, Morlan BW, Ballman KV, Jenkins RB, Toft DO, Erlichman C. “P-Glycoprotein-mediated resistance to Hsp90-directed therapy is eclipsed by the heat shock response”. *Cancer Res* 68(18):7419-27. Septiembre 2008.

Miao ZH, Ding J. “Transcription factor c-Jun activation represses mdr-1 gene expression”. *Cancer Res* 63(15):4527-32. Agosto 2003.

Mizutani T, Masuda M, Nakai E, Furumiya K, Togawa H, Nakamura Y, Kawai Y, Nakahira K, Shinkai S, Takahashi K. “Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1)”. *Curr Drug Metab* 9(2):167-174. 2008.

Mosmann T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. Diciembre 1983.

Nature America Inc. “Cancer multidrug resistance: Progress in understanding the molecular basis of drug resistance in cancer promises more effective treatments”. *Nat Biotech*, 18 (sup): IT18-20. 2000.

Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. “Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation”. *Genes & Dev* 17: 1475–1496. Junio 2003.

Notarbartolo M, Cervello M, Dusonchet L, Cusimano A, D'Alessandro N. “Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins)”. *Cancer Lett* 180(1):91-101. Junio 2002.

Okamura N, Sakaeda T, Okumura T.”Pharmacogenomics of MDR and MRP subfamilies”. *Future medicine* 1(1): 85-104. 2004.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. “PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects”. *Cell* 118(3):375-87. Agosto 2004.

Pawlik A, Baskiewicz-Masiuk M, Machalinski B, Kurzawski m, Gawronska-Szklarz B. “Involvement of C3435T and G2677T multidrug resistance gene polymorphisms in release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone”. *Eur J Pharmacol* 528(1-3):27-36. Diciembre 2005.

Pluchino KM, Hall MD, Goldsborough AS, Callaghan R, Gottesman MM. “Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance”. *Drug Resist Updat* 15(1-2):98-105. Abril 2012.

Raghu G, Park SW, Roninson IB, Mechetner EB. “Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, and MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes”. *Exp Hematol* 24(10):1258-64. Agosto 1996.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. “Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?”. *Free Radic Biol Med* 49(11):1603-16. Diciembre 2010.

Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. “Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase”. *Nature* 403(6765):103-8. Enero 2000.

Rubinfeld H, Seger R. “The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling”. *Mol Biotechnol* 31(2):151-74. Octubre 2005.

Ruefli AA, Bernhard D, Tainton KM, Kofler R, Smyth M, Johnstone RW. “Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells”. *Int J Cancer* 99:292-298. 2002(a).

Ruefli AA, Smyth MJ, Johnstone RW. “HMBA induces activation of a caspase-independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance”. *Blood* 95:2378-2385. 2000.

Ruefli AA, Tainton KM, Darcy PK, Smyth MJ, Johnstone RW. “P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation”. *Cell Death and Differentiation* 9:1266-1272. 2002 (b).

Scotto K.W., Johnson R.A. “Transcription of the Multidrug Resistance Gene MDR1: A Therapeutic Target”. *Molecular Interventions*, vol.1, issue 2, p 117-125. Junio 2001.

Seo SB, Hur JG, Kim MJ, Lee JW, Kim HB, Bae JH, Kim DW, Kang CD, Kim SH. “TRAIL sensitize MDR cells to MDR-related drugs by down-regulation of P-glycoprotein through inhibition of DNA-PKcs/Akt/GSK-3beta pathway and activation of caspases”. *Mol Cancer* 9:199. Julio 2010.

Shain KH, Dalton WS. “Cell adhesion is a key determinant in *de novo* multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR”. *Mol Cancer Ther* 1(1):69-78. Noviembre 2001.

Shukla A, Timblin CR, Hubbard AK, Bravman J, Mossman BT. “Silica-induced activation of c-Jun-NH2-terminal amino kinases, protracted expression of the activator protein-1 proto-oncogene, fra-1, and S-phase alterations are mediated via oxidative stress”. *Cancer Res* 6(5):1791-5. Marzo 2001.

Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. “Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein”. *Cancer Chemother Pharmacol* 40 Suppl:S13-9. 1997.

Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. “Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System”. *Exp Biol Med* 228:995–1003. Octubre 2003.

Smolewski P, Robak T. “Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies”. *Curr Mol Med* 11(8):633-49. Noviembre 2011.

Stout BA, Karla Melendez, JeanClare Seagrave, Michael J. Holtzman, Bridget Wilson, Jialing Xiang, Yohannes Tesfaigzi. “STAT1 Activation Causes Translocation of Bax to the Endoplasmic Reticulum during the Resolution of Airway Mucous Cell Hyperplasia by IFN-gamma”. *Immunol* 178:8107-8116. 2007.

Sui H, Fan Z-Z, Li Q. “Signal Transduction Pathways and Transcriptional Mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated Multiple Drug Resistance in Human Cancer Cells”. *J Int Med Res* (40):426-35. Abril 2012.

Sui H, Zhou S, Wang Y, Liu X, Zhou L, Yin P, Fan Z, Li Q. “COX-2 contributes to P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via phosphorylation of c-Jun at Ser63/73 in colorectal cancer”. *Carcinogenesis* 32(5):667-75. Mayo 2011.

Sukhai M and Piquetee-Miller Micheline. “Regulation of the Multidrug Resistance Genes by Stress Signals”. *J Pharm Pharmaceuti Sci* 3(2):268-280. 2000.

Suzuki K, Hasegawa T, Sakamoto C, Zhou YM, Hato F, Hino M, Tatsumi N, Kitagawa S. “Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines”. *J Immunol* 166(2):1185-92. Enero 2001.

Tahir SK, Yang X Anderson MG, Morgan-Lappe SE, Sarthy AV, Chen J, Warner RB, Ng SC, Fesik SW, Elmore SW, Rosenberg SH, Tse C. “Influence of Bcl-2 Family Members on the Cellular Response of Small-Cell Lung Cancer Cell Lines to ABT-737”. *Cancer Res* 67(3):1176–83. 2007.

Tainton KM, Smyth MJ, Jackson JT, Tanner JE, Cerruti L, Jane SM, Darcy PK, Johnstone RW. “Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug efflux”. *Cell Death Differ* 11(9):1028-37. Septiembre 2004.

Tait AS, Tarrant RD, Velez-Suberbie ML, Spencer DI, Bracewell DG. “Differential response in downstream processing of CHO cells grown under mild hypothermic conditions”. *Biotechnol Prog Epub* doi:10.1021/btpr.1726. Marzo 2013.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9):4350-4. Septiembre 1979.

Turella P, Filomeni G, Dupuis ML, Ciriolo MR, Molinari A, De Maria F, Tombesi M, Cianfriglia M, Federici G, Ricci G, Caccuri AM. “A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the P-glycoprotein-mediated resistance in tumor cells. 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells”. *J Biol Chem* 281(33):23725-32. Agosto 2000.

Ugurel S, Seiter S, Rappl G, Stark A, Tilgen W, Reinhold U. “Heterogeneous susceptibility to CD95-induced apoptosis in melanoma cells correlates with bcl-2 and bcl-x expression and is sensitive to modulation by interferon-gamma”. *Int J Cancer* (82):727-736. 1999.

van de Ven R, Oerlemans R, van der Heijden JW, Scheffer GL, de Gruijl TD, Jansen G, Scheper RJ. “ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer”. *J Leukoc Biol* 86(5):1075-87. Noviembre 2009.

van der Kolk DM, de Vries EG, Müller M, Vellenga E. “The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia”. *Leuk Lymphoma* 43(4):685-701. Abril 2002.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. “A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)”. *J Biol Chem* 269(7):5241-8. Febrero 1994.

Wartenberg M, Gronczynska S, Bekhite MM, Saric T, Niedermeier W, Hescheler J, Sauer H. “Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species”. *Int J Cancer* 113:229-240. Enero 2005.

Wartenberg M, Gronczynska S, Bekhite MM, Saric T, Niedermeier W, Hescheler J, Sauer H. “Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species”. *Int J Cancer* 113(2):229-40. Enero 2005.

Wartenberg M, Ling FC, Müschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Pütz V, Hescheler J, Sauer H. “Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species”. *FASEB J* 17(3):503-5. Marzo 2003.

Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kähäri VM. “p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression”. *Mol Cell Biol* 21(7):2373-83. Abril 2001.

Widmann C, Gibson S, Johnson GL. “Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals”. *J Biol Chem* 273(12):7141-7. Marzo 1998.

Willman C. “The prognostic significance of the expression and function of multidrug resistance transporter proteins in acute myeloid leukemia studies of the Southwest Oncology Group Leukemia Research Program”. *Seminars in Hematology* 34(5):25-53. 1997.

Xu H, Goldfarb M. “Multiple effector domains within SNT1 coordinate ERK activation and neuronal differentiation of PC12 cells”. *J Biol Chem* 276(16):13049-56. Abril 2001.

Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, van Dyke T. “Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo”. *Nature* 385(6617):637-40. 1997.

Youle RJ, Strasser A. “The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death”. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47–59. 2008.

Yu WP, Liao QY, Hantash FM, Sanders BG, Kline K. “Activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein kinases is required for RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells”. *Cancer Res* 61:6569-76. 2001.

Zhang JY, Wu HY, Xia XK, Liang YJ, Yan YY, She ZG, Lin YC, Fu LW. “Anthracenedione derivative 1403P-3 induces apoptosis in KB and KBv200 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial pathway and death receptor pathway”. *Cancer Biol Ther* 6(9):1413-21. Septiembre 2007.

Zhang X, Yashiro M, Qiu H, Nishii T, Matsuzaki T, Hirakawa K. “Establishment and characterization of multidrug-resistant gastric cancer cell lines”. *Anticancer Res* 30(3):915-21. Marzo 2010.

Zhou F, Yang Y, Xing D. “Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis”. *FEBS J* 278(3):403-13. Febrero 2011.

Zhou J, Liu M, Aneja R, Chandra R, Lage H, Joshi HC. “Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase”. *Cancer Res* 66(1):445-52. Enero 2006.