

RESULTADOS

4. RESULTADOS

RI. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA WP631 EN LAS LÍNEAS CELULARES JURKAT T, MCF-7/VP Y MDA-MB-231

4.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS ANTRACICLINAS DE INHIBIR LA PROLIFERACIÓN EN LAS LÍNEAS CELULARES JURKAT T, MDA-MB-231 Y MCF-7/VP

En primer lugar se determinó la densidad del inóculo inicial que asegurara que, durante la realización de los experimentos, las células crecían exponencialmente. Se sembraron diferentes densidades de cultivo (625, 1250, 2500, 3500, 5000, 10000 y 15000 células/ml) de cada línea celular y, 24 horas después, se determinó el crecimiento de los inóculos a lo largo del tiempo (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas), mediante el ensayo colorimétrico del MTT (Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se utilizaron para construir las curvas de crecimiento que se muestran en la Figura R1. En todos los casos analizados se observó que la absorbancia era directamente proporcional al número de células sembradas. Se puede observar que tanto en el caso de la línea de células leucémicas Jurkat T como en el caso de la línea de carcinoma mamario MCF-7/VP se obtuvo un crecimiento exponencial hasta las 120 horas a partir de un inóculo de 2500 células/ml (Figuras R1A y R1C). Por otro lado, para obtener un crecimiento exponencial hasta las 120 horas, fue necesario inocular el doble de células MDA-MB-231, es decir, 5000 células/ml de cultivo (Figura R1B). Teniendo en cuenta estos resultados se decidió iniciar los experimentos sembrando 2500 células/ml en el caso de las líneas Jurkat y MCF-7/VP y 5000 células/ml en el caso de la línea MDA-MB-231. De esta manera, como los tratamientos con las Antraciclinas comenzaban 24 horas después de haber inoculado los subcultivos, los experimentos realizados con las líneas Jurkat y MCF-7/VP partían de una densidad de 5000 células/ml, mientras que para las células MDA-MB-231 se partió de 10000 células/ml.

La capacidad de las Antraciclinas Daunorubicina y Doxorubicina, y la Bisantraciclina WP631 de inhibir el crecimiento celular se determinó también mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Las células se incubaron con concentraciones

crecientes de cada fármaco durante 24, 48, 72 y 96 horas, y se determinó la capacidad de proliferación de las células (Materiales y Métodos). A partir de los resultados obtenidos se construyeron las curvas de supervivencia que se muestran en la Figura R2. A partir de estos resultados se calcularon las concentraciones de cada molécula que inhiben el crecimiento celular un 50 ó un 75%, dosis IC_{50} e IC_{75} , respecto a las mismas células sin tratar.

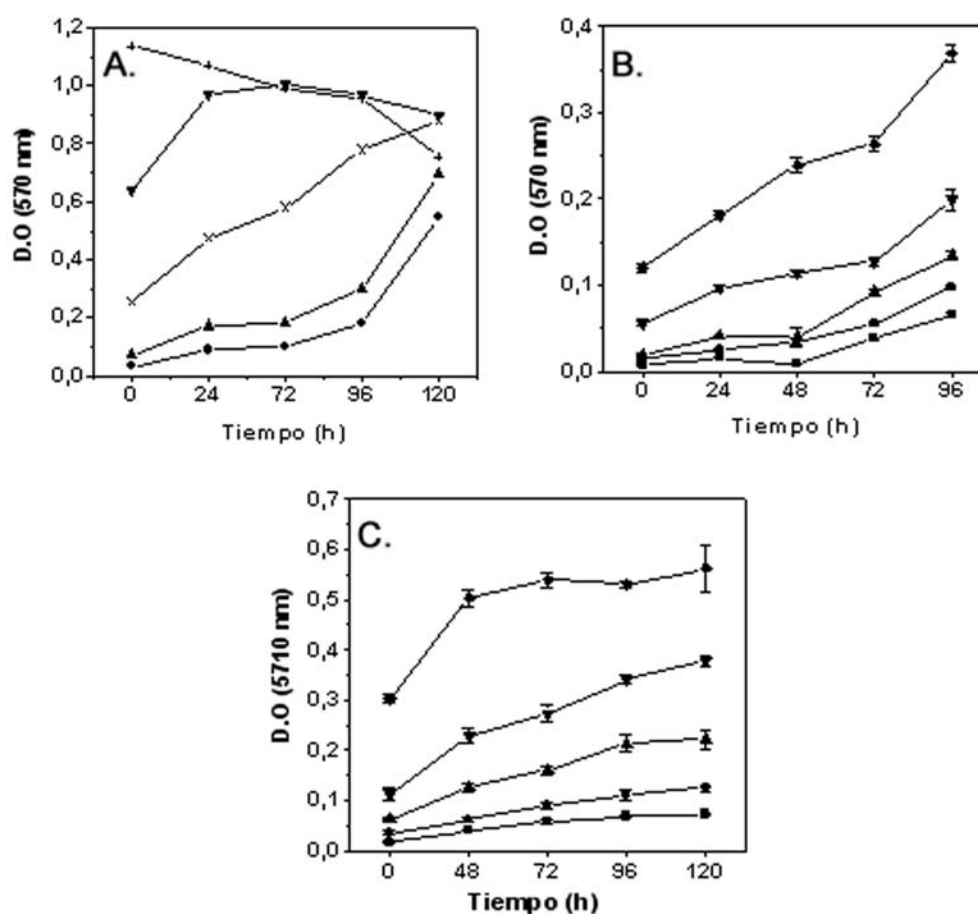


Figura R1. Determinación del inóculo celular inicial para la realización de los experimentos en condiciones de crecimiento exponencial. (A) Jurkat T, MDA-MB-231 (B) y MCF-7/VP (C). Se sembraron diferentes densidades de células (■, 625 células; ●, 1250 células; ▲, 2500 células; X, 3500 células; ▼, 5000 células; ◆, 10000 células; +, 15000 células) y se determinó la densidad del inóculo que aseguraba el crecimiento exponencial de las células durante 96-120 horas, mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Se indica la duración de los tratamientos (eje de las ordenadas) y la absorbancia de las células (eje de las coordenadas). Se representa el valor promedio de 6 experimentos independientes y la desviación estándar.

La Tabla R1 (panel superior) muestra los valores IC_{50} e IC_{75} calculados para las células Jurkat después de 72 horas de tratamiento continuo con Daunorubicina o

WP631. Las concentraciones IC_{50} e IC_{75} obtenidas para la Daunorubicina fueron 82.62 nM y 182.18 nM (valores promedio) respectivamente. En el caso de la WP631, el valor obtenido para la IC_{50} fue de 17.7 nM, mientras que la IC_{75} tenía un valor de 60.02 nM.

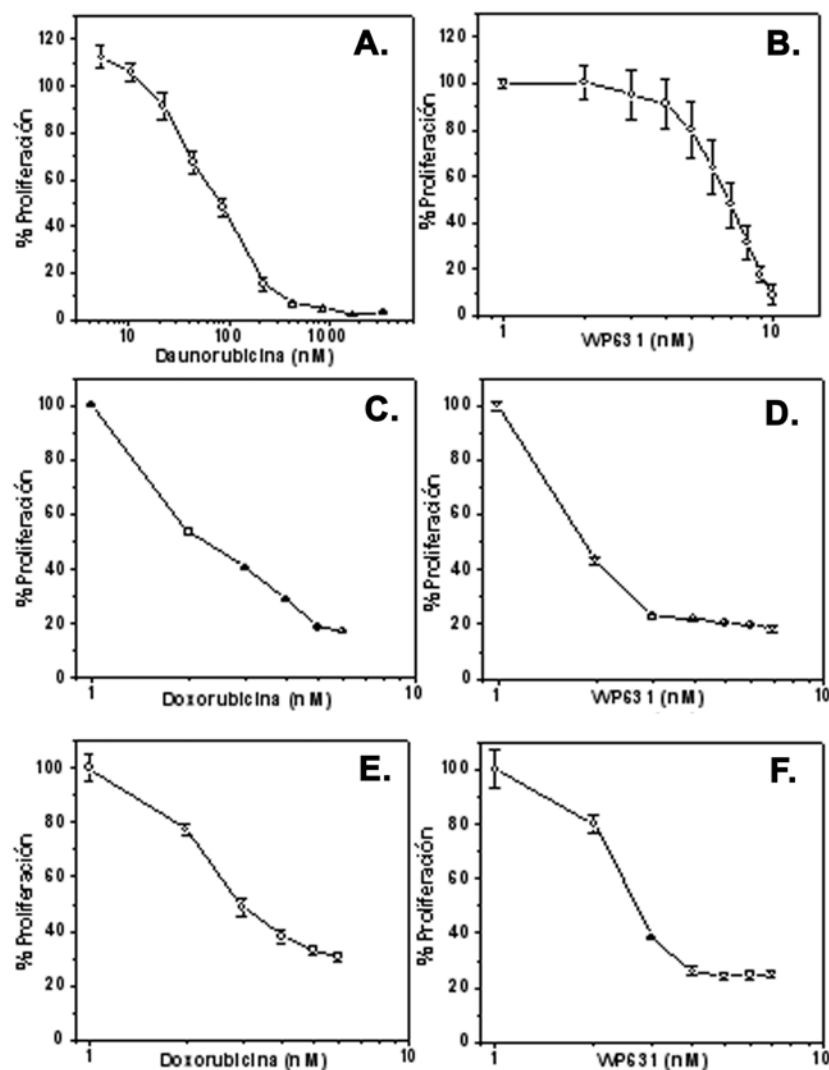


Figura R2. Citotoxicidad de la Daunorubicina, la Doxorubicina y la WP631 en células Jurkat T (A y B), MDA-MB-231 (C y D) y MCF-7/VP (E y F). La supervivencia se determinó mediante el método del MTT en células incubadas con Antraciclinas durante 72 (células Jurkat T) ó 96 horas (células MDA-MB-231 y MCF-7/VP) (véase Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como el porcentaje de supervivencia celular respecto al control sin tratar, que representa el 100%. Se representa el promedio y la SEM de 6-11 experimentos independientes.

Los valores IC_{50} e IC_{75} para la Doxorubicina o la WP631 en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7/VP se determinaron tras 96 horas de tratamiento continuo con los fármacos (Tabla R1).

En el caso de la línea MDA-MB-231 (Tabla R1, panel central), los valores IC_{50} e IC_{75} calculados para la Doxorubicina fueron 212.3 nM y 1.94 μ M, respectivamente, mientras que las IC_{50} e IC_{75} obtenidas para la WP631 fueron 59.27 nM y 156.54 nM, respectivamente.

El valor IC_{50} para la Doxorubicina calculada en las células MCF-7/VP (Tabla R1, panel inferior) fue de 306.4 nM, mientras que la IC_{75} a las 96 horas fue superior a 3.3 μ M. Teniendo en cuenta que en clínica las concentraciones iniciales de Antraciclinas en plasma no suelen ser superiores a 2 μ M (Gewirtz, 1999), un tumor se puede considerar resistente a un tratamiento cuando las dosis efectivas para remitir su progresión son dosis supraclínicas. Por este motivo, se decidió descartar el uso de la dosis IC_{75} para la Doxorubicina en los experimentos posteriores con las células MCF-7/VP. Por otro lado, las concentraciones IC_{50} e IC_{75} obtenidas para la WP631 en la línea MCF-7/VP fueron 122.1 nM y 594,3 nM, respectivamente.

Tabla R1. Valores de las concentraciones de Daunorubicina, Doxorubicina y WP631 que inhiben el crecimiento celular un 50% (dosis IC_{50}) o un 75% (dosis IC_{75}) en las líneas Jurkat T, MDA-MB-231 y MCF-7/VP. Los valores se determinaron a partir de los resultados de las curvas de crecimiento que se muestran en la Figura R2. Se indican los valores promedio y la SEM de, al menos, seis experimentos independientes.

Jurkat T	IC_{50} (nM)	IC_{75} (nM)
Daunorubicina	82.62 \pm 8.87	182.18 \pm 13.30
WP631	17.70 \pm 6.00	60.02 \pm 19.50
<i>Ratio</i> DAU/WP	4.7	3
MDA-MB-231	IC_{50} (nM)	IC_{75} (nM)
Doxorubicina	212.3 \pm 3.22	1940 \pm 0.48
WP631	59.27 \pm 0.90	156.54 \pm 0.51
<i>Ratio</i> DOX/WP	3.6	12.4
MCF-7/VP	IC_{50} (nM)	IC_{75} (nM)
Doxorubicina	306.4 \pm 1.28	> 3300
WP631	122.1 \pm 0.01	594.3 \pm 3.19
<i>Ratio</i> DOX/WP	2.5	> 5.6

Se ha demostrado que las concentraciones de WP631 necesarias para inhibir el crecimiento celular fueron siempre inferiores a las de Daunorubicina o Doxorubicina, que inhibían el crecimiento de las células de manera equivalente. De estos resultados se deduce que, al menos en las líneas celulares analizadas, la WP631 se comportó como un agente antiproliferativo muy eficaz.

A la hora de diseñar los experimentos que se mostrarán a continuación decidimos realizar tratamientos continuos con las diferentes dosis de Antraciclinas durante 72 ó 96 horas (según el momento en que se determinaron los valores IC_{50} e IC_{75} para los fármacos). Pasado este periodo de tiempo, se sustituyó el medio de cultivo por medio libre de fármaco. De esta manera, nos asegurábamos de que el efecto de los fármacos se mantenía con el tiempo, incluso en ausencia de los fármacos.

4.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS Y CITOSTÁTICOS DE LAS ANTRACICLINAS EN LAS LÍNEAS CELULARES JURKAT T, MDA-MB-231 Y MCF-7/VP

El ensayo del MTT nos permitió determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento celular inducido por Antraciclinas. Sin embargo, este tipo de ensayo no permite discriminar si la inhibición del crecimiento se debe a la inducción de muerte celular (efecto citotóxico) o a la parada de la progresión del ciclo celular (efecto citostático). Por este motivo, decidimos realizar el recuento de la mortalidad celular y analizar la distribución de las fases del ciclo celular a lo largo del tiempo.

4.2.1. Análisis de la mortalidad celular inducida por Antraciclinas

El recuento del número de células vivas y muertas tras los tratamientos, se realizó mediante una tinción con azul de tripano, a lo largo de diferentes tiempos.

Los tratamientos realizados con Daunorubicina en las células Jurkat T provocaron la muerte celular rápida (Tabla R2). La mortalidad en células Jurkat T tratadas con 182 nM Daunorubicina (valor IC_{75}) durante 48 horas fue cercana al 100%. El tratamiento con la mitad de la dosis, 91 nM ($\sim IC_{50}$), indujo un 36% de muerte celular a las 24 horas y, prácticamente, todas las células estaban muertas a las 48 horas. Los resultados obtenidos con los tratamientos de las células Jurkat T con 18 y 60 nM WP631 (IC_{50} e IC_{75} , respectivamente) fueron, sin embargo, muy diferentes. La Tabla R2 muestra como, en los dos casos, la mortalidad fue muy reducida (2-3%) hasta las 72

horas de tratamiento. La mortalidad celular inducida por 60 nM WP631 aumentó de manera significativa entre uno y dos días tras el cambio de medio de cultivo, pasando de ~80 % a un 100 %. La mortalidad inducida por el tratamiento continuo durante 72 horas con 18 nM WP631 se mantuvo baja hasta dos días después de haber cambiado el medio de cultivo (4.6 %). La muerte celular aumentó entre los seis y nueve días tras el cambio del medio (desde ~50% hasta el 100%).

Las células MDA-MB-231 y MCF-7/VP crecen adheridas en los frascos de cultivo. Las células que mueren se van “desenganchando” de la superficie y se encuentran en suspensión en el sobrenadante. Por este motivo, el recuento de la mortalidad se realizó en las células adheridas a los frascos y en las células en suspensión. Los resultados que se muestran en la Tabla R2 corresponden al recuento de la mortalidad celular en las monocapas (células adheridas) ya que, en muchos casos, los sobrenadantes contenían gran cantidad de fragmentos o *debris* celulares, imposibilitando realizar un recuento fiable. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que la mortalidad celular total en estos casos (células adheridas y en suspensión), fue siempre superior a los valores que se muestran en la Tabla R2 y que, los valores más altos de mortalidad, se obtuvieron en los sobrenadantes (células en suspensión).

Las dosis IC_{50} e IC_{75} determinadas a las 96 horas para la Doxorubicina en la línea MDA-MB-231, indujeron un incremento progresivo de la mortalidad celular en las células adheridas (Tabla R2). Tres días después de haber cambiado el medio de cultivo, no encontramos células adheridas en los cultivos tratados con 2 μ M Doxorubicina (IC_{75}). Toda la población celular se encontraba en el sobrenadante, con casi un 100% de mortalidad (teñidas con azul de tripano). La IC_{50} (212 nM), provocó el mismo efecto cinco días después de haber cambiado el medio de cultivo. Las dos concentraciones de WP631 analizadas (dosis IC_{50} e IC_{75}) indujeron un comportamiento celular similar, aunque la máxima mortalidad celular no se produjo hasta los siete días tras el cambio del medio de cultivo (Tabla R2). En todos los casos analizados, la inducción de la muerte celular en esta línea fue un fenómeno más lento que en células Jurkat T.

Tabla R2. Recuento de la mortalidad celular en células Jurkat T (parte superior), MDA-MB-231 (parte central) y MCF-7/VP (parte inferior) tratadas con las dosis IC₅₀ e IC₇₅ para la Daunorubicina, Doxorubicina o WP631 durante 72 ó 96 horas (véase 4.1) con posterior cambio del medio de cultivo. Se realizó el recuento de la mortalidad a lo largo del tiempo, mediante una tinción con azul de tripano. El recuento se realizó cuatro veces, obteniéndose resultados similares. El símbolo – representa el momento en que la mortalidad fue del 100%, o bien aquellos casos en que no había células adheridas en la superficie de los frascos porque éstas estaban muertas en el sobrenadante.

Jurkat T	4 h	24 h	48 h	72 h	72h+1d	72h+2d	72h+6d	72h+9d
91 nM Daunorubicina	8	36	~100	-	-	-	-	-
182 nM Daunorubicina	7	78	~100	-	-	-	-	-
18 nM WP631	0.9	2	2.4	3	4.3	4.6	53.5	~100
60 nM WP631	4	5	7	8	82	~100	-	-
MDA-MB-231	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h	96h+3d	96h+5d	96h+7d
212 nM Doxorubicina	8.9	21.3	63.9	30.4	40.9	98	~100	-
2 µM Doxorubicina	2.4	17.9	38.9	32.8	50	~100	-	-
59 nM WP631	7.7	14.3	45.1	31.6	26.7	25.5	98	~100
157 nM WP631	8.3	18.9	32.2	35.6	68.4	72.8	87,9	~100
MCF-7/VP	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h	96h+3d	96h+5d	96h+7d
307 nM Doxorubicina	9	31.8	20	21	20	23.3	24.9	15.5
122 nM WP631	2.4	25	35	45	18	13.3	3.7	0.3
594 nM WP631	7.7	25	35.2	35.2	25	~100	-	-

La Tabla R2 muestra también el recuento de la mortalidad celular de la monocapa (células adheridas) correspondiente a células MCF-7/VP. Se puede observar que los tratamientos con 307 nM Doxorubicina y 122 nM WP631 (dosis IC₅₀ para los dos fármacos, respectivamente) no indujeron la muerte del 100% de las células. La mortalidad de las células tratadas con 307 nM Doxorubicina pasó de ~25% a los 3 días del cambio de medio, al ~15% 2 días después. Por otro lado, la mortalidad de las células MCF-7/VP tratadas con 122 nM WP631 se redujo a partir de las 72 horas de tratamiento

(pasando de un 45% a menos del 1% 7 días después del cambio de medio de cultivo). El único tratamiento que produjo el 100% de muerte 3 días después al cambio de medio fue 594 nM WP631 (valor IC_{75} determinado a las 96 horas).

De estos resultados se deduce que el comportamiento de la línea celular MCF-7/VP es heterogéneo: está formada por una subpoblación sensible a todos los tratamientos analizados, y por otra subpoblación “más resistente”, que responde únicamente al tratamiento con la IC_{75} para la WP631. Estos resultados indican que las células MCF-7/VP son resistentes a la Doxorubicina y al tratamiento con la IC_{50} para la WP631.

4.2.2. Análisis de las perturbaciones del ciclo celular inducidas por Antraciclinas

Si se comparan los resultados del ensayo del MTT (Figura R2) con los resultados de mortalidad celular, se observa que la inhibición del crecimiento celular no siempre estaba asociada a la inducción de la muerte celular (Tabla R2). Este fenómeno se observa con mayor claridad en las células Jurkat T, ya que al crecer en suspensión, se pudo realizar el recuento de mortalidad sobre el total de la población celular. A modo de ejemplo, 60 nM WP631 inhibió, a las 72 horas de tratamiento continuo, el crecimiento del 75% de las células (Figura R2). Sin embargo, la mortalidad celular inducida tras 72 horas con este tratamiento, no superó el 8% (Tabla R2). A partir de estos resultados se deduce que la inhibición del crecimiento celular podría estar causada, al menos inicialmente, por la parada de la progresión el ciclo celular en alguna de sus fases. Por este motivo, decidimos realizar una tinción con yoduro de propidio y analizar la distribución de las diferentes fases del ciclo en un citómetro de flujo.

La Figura R3 muestra las variaciones temporales en la distribución del ciclo celular de las células tratadas con los diferentes fármacos y dosis, teñidas con yoduro de propidio y analizadas en un citómetro de flujo. Se realizó en paralelo el análisis de la distribución del ciclo celular de células sin tratar (control). Se analizó la distribución de las diferentes fases del ciclo celular de cultivos tratados con las dosis IC_{50} e IC_{75} , determinadas para los fármacos a las 72 horas, en el caso de las células Jurkat T, o a las 96 horas en el caso de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7/VP (Tabla R1). En todas las líneas celulares analizadas, las células control mantuvieron un patrón de distribución constante a lo largo del tiempo, típico de las células que proliferan con normalidad, con la mayoría de células en la fase G_1 (Figura R3).

El análisis del ciclo celular reveló que el comportamiento de las células Jurkat T dependía de la dosis de Daunorubicina utilizada (Figura R3A). Los tratamientos continuos durante 72 horas, tanto con la dosis IC_{75} (182 nM) como la mitad de la concentración (91 nM, \sim dosis IC_{50}), indujeron la muerte celular de forma masiva a las 72 horas. Por este motivo, se analizó la distribución del ciclo celular a las 4, 10, 24 y 48 horas de tratamiento con las diferentes dosis de Daunorubicina. Se puede observar que la dosis de Daunorubicina de 182 nM indujo la muerte celular rápidamente (entre las 4 y 10 horas de tratamiento), ya que el pico de células en fase sub- $G_{0/1}$ aumentó significativamente en estos tiempos (Figura R3A). Las células se acumularon en las fases G_1 y S del ciclo celular y después murieron. Cuando se utilizó una dosis inferior de Daunorubicina (91 nM) los efectos observados a nivel celular fueron claramente diferentes. Este tratamiento indujo la parada del ciclo celular en la fase G_2/M , entre las 10 y las 24 horas de tratamiento continuo (Figura R3A). Se puede observar como, a las 48 horas, la distribución del ciclo celular se encontraba alterada, no pudiéndose distinguir claramente las diferentes fases, indicativo del inicio de la muerte celular (Figura R3A). De estos resultados se deduce que los efectos de la Daunorubicina sobre la línea celular Jurkat T dependen de la dosis utilizada. Las dosis más altas se asocian a la muerte rápida de las células desde las fases G_1 y S (patrón típico de la muerte por apoptosis dependiente de $p53$), mientras que el tratamiento con dosis menores pone de manifiesto lo que parece un fenómeno de muerte celular diferente a la apoptosis, que tiene lugar más lentamente y desde la fase G_2/M .

Cuando se trataron las células Jurkat T con 18 nM ó 60 nM WP631 (dosis IC_{50} e IC_{75}) los efectos que se observaron a nivel celular fueron similares. A partir de este resultado se adoptó el criterio de trabajar únicamente con la dosis IC_{75} para los fármacos cuando las dosis IC_{75} e IC_{50} provocaran los mismos efectos a nivel celular. La figura R3A muestra los resultados de la distribución del ciclo de células tratadas con 60 nM WP631. Entre las 72 y 78 horas de tratamiento, la dosis IC_{75} para la WP631 indujo la parada del ciclo celular en la fase G_2/M y la aparición de un pico de células poliploides (8n). A las 72 h de tratamiento había, aproximadamente, un 6% de células poliploides y casi un 10%, respecto al total de células, a las 75 horas. A las 78 horas el porcentaje de células poliploides se redujo al 3.5%, momento en que el ciclo celular comenzó a alterarse y a aumentar el pico sub- $G_{0/1}$, correspondiente a células muertas. Estos resultados indican que la WP631 induce la muerte celular a través de un mecanismo

totalmente diferente a la apoptosis, posiblemente induciendo catástrofe mitótica (véase Introducción). Sorprendió que a pesar de ser muy citotóxica en células Jurkat T (Tabla R1), la WP631 indujera un mecanismo de muerte diferente a la apoptosis, especialmente en una línea celular con *p53* funcional como las células Jurkat T. Por este motivo, y aprovechando que las líneas MDA-MB-231 y MCF-7/VP son resistentes a la apoptosis (Materiales y Métodos), decidimos analizar más detalladamente este fenómeno sobre las células que crecían adheridas a los frascos..

La Figura R3B muestra la distribución de fases de células MDA-MB-231 tratadas con 2 μ M Doxorubicina ó 157 nM WP631 (dosis IC_{75}). Se observa como los tratamientos durante 96 horas con 2 μ M Doxorubicina ó 157 nM WP631 provocaron la acumulación de las células en la fase G_2/M . También se observó la acumulación de células poliploides, especialmente en las células tratadas con WP631. Se observó que, tres días después del cambio de medio, ya no había células creciendo adheridas a los frascos en los cultivos tratados con 2 μ M Doxorubicina. Las células se encontraban en el sobrenadante y la gran mayoría estaba muerta (análisis realizado mediante la tinción con azul de tripano). Sin embargo, el tratamiento con 157 nM WP631, provocó la muerte de las células de manera más lenta (Figura R3B): a los siete días tras el cambio de medio, la totalidad de las células se encontraban en suspensión y teñidas con azul de tripano. De estos resultados se deduce que, tanto la Doxorubicina como la WP631, inducen la acumulación de células MDA-MB-231 4n y 8n, y la muerte posterior por un proceso de tipo no-apoptótico.

La Figura R3C muestra la distribución de las células MCF-7/VP tratadas durante 96 h con 307 nM Doxorubicina (dosis IC_{50}). Se puede observar que, a las 96 horas de tratamiento continuo, la Doxorubicina indujo la acumulación de células 4n (G_2/M) y poliploides (8n). Este patrón se mantuvo en el tiempo hasta 5 días después de haber eliminado el fármaco del medio de cultivo. A partir de este momento, las células parecían recuperarse, ya que la distribución de ciclo celular fue comparable a la de las células sin tratar (con una mayoría de la población en la fase G_1). Esta distribución se mantuvo hasta 12 días después de haberse cambiado el medio de cultivo (Figura R4). Cuando las células se trataron con WP631, la distribución del ciclo celular fue diferente según la dosis usada.

El tratamiento de las células MCF-7/VP durante 96 horas con 594 nM WP631 (dosis IC_{75}), indujo también la parada en G_2/M y la aparición de células poliploides

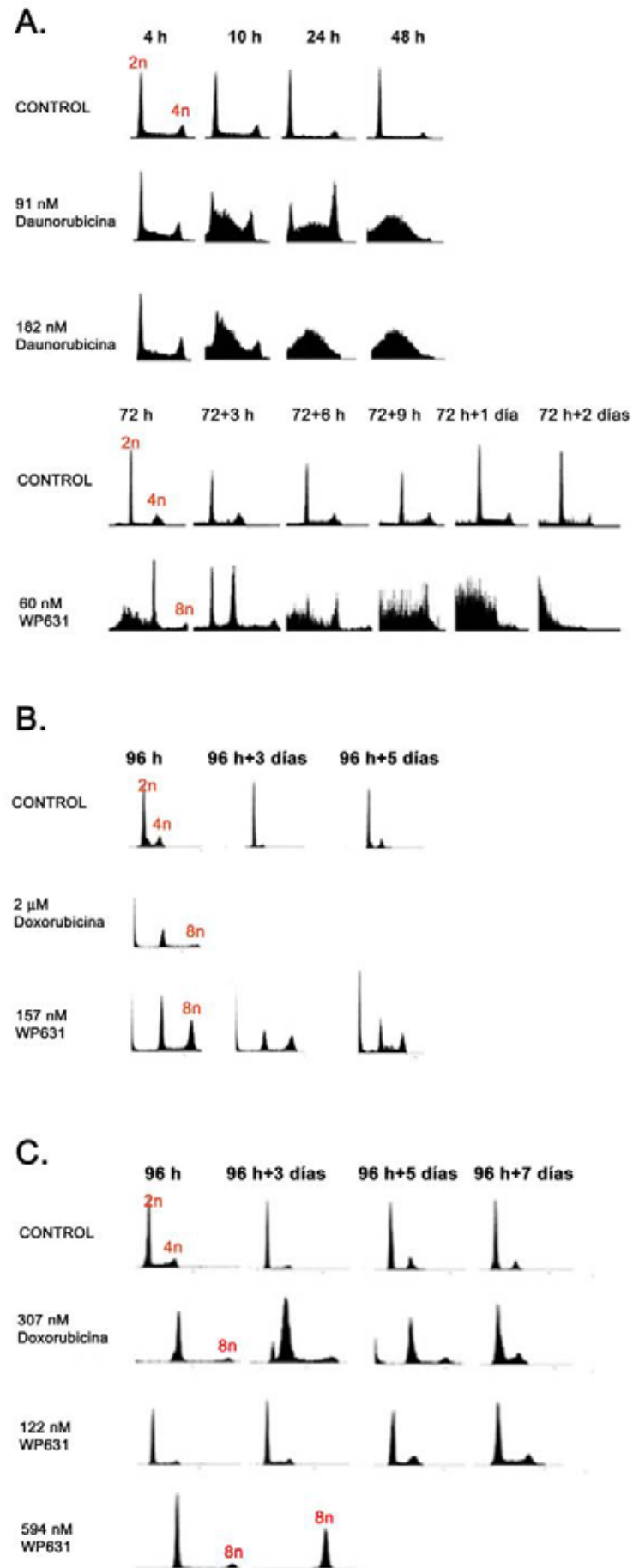
(Figura R3C). A diferencia de los resultados obtenidos con la Doxorubicina, tres días después de haber cambiado el medio de cultivo, todas las células se encontraron formando parte del pico 8n. Estas células poliploides murieron a los cinco días del cambio de medio, encontrándose en su totalidad flotando en el sobrenadante. Sin embargo, cuando se utilizó la dosis IC_{50} determinada para la WP631, 122 nM, las células se mantuvieron vivas hasta 12 días después de haber retirado el fármaco del cultivo, manteniendo una distribución del ciclo celular, con la mayoría de células en la fase G_1 , igual que las células control (Figura R3C y Figura R4). Estos resultados confirmaron que la línea celular MCF-7/VP no responde ni a la Doxorubicina ni al tratamiento con 122 nM WP631, mientras que, únicamente los tratamientos con la dosis IC_{75} para la WP631 (594 nM) inducen la muerte celular de tipo no-apoptótico.

4.3. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7/VP

Decidimos realizar ensayos adicionales que permitieran confirmar con toda seguridad la resistencia de las células MCF-7/VP a la Doxorubicina y a la dosis IC_{50} para la WP631.

4.3.1. Ensayos de proliferación celular

Se realizó una comparación de los resultados de mortalidad celular, obtenidos mediante tinción con azul de tripano (Tabla R2), con los patrones de la distribución del ciclo celular de células MCF-7/VP tratadas con 307 nM Doxorubicina (IC_{50}), 122 nM WP631 (IC_{50}) ó 594 nM WP631 (IC_{75}). Se estudiaron las células que estaban adheridas en los frascos (células con baja mortalidad) y las células presentes en los sobrenadantes (células con alta mortalidad) (Figura R4). Se trataron las células durante 96 horas y se sustituyó el medio de cultivo por medio libre de fármaco. La tinción con yoduro de propidio se realizó sobre las células adherentes y en suspensión, 7 y 12 días después del cambio de medio. En los cultivos control la distribución de las células adheridas 7 días después del cambio de medio fue normal, pero debido a la falta de superficie de crecimiento, en el sobrenadante también detectamos células viables (acumuladas en G_1) y un cierto porcentaje de células muertas (pico sub- $G_{0/1}$) (Figura R4). Sin embargo, a los 12 días del cambio de medio de cultivo, las células control que se encontraban tanto adheridas como en suspensión en el sobrenadante, estaban muertas (pico sub- G_0).



Esto se debe a que, al tratarse de células que proliferaban con normalidad, los nutrientes y la superficie para seguir proliferando en los frascos, se reducen con el tiempo. Por otro lado, cuando se trataron las células con 307 nM Doxorubicina, una parte de las células estaban muertas en los sobrenadantes o acumuladas en la fase G₂/M. Se puede observar que otra parte quedaba adherida a los frascos. Estas células que, inicialmente se acumularon en la fase G₂/M (Figura R3), a partir de los 7 días del cambio de medio de cultivo, parecían completar la mitosis y recuperar una distribución de fases comparable al control. El recuento de mortalidad reveló que estas células eran viables (Tabla R2). De la misma manera, se puede comprobar que, a los 7 y 12 días del cambio de medio, parte de las células tratadas con 122 nM WP631 se encontró en el sobrenadante, muerta o acumulada en la fase G₂/M, mientras que otra parte se encontraba adherida al frasco, con una distribución equiparable a las células sin tratar. Estos resultados confirman la heterogeneidad en el comportamiento de la línea MCF-7/VP: mientras un grupo de células fue sensible a los tratamientos con 307 nM Doxorubicina ó 122 nM WP631, induciendo la muerte celular desde la fase G₂/M, otro grupo fue capaz de recuperarse o de no responder a los tratamientos (células resistentes) (Figuras R3 y R4). Por este motivo, al haber muerto parte de la población, las células resistentes disponían de superficie suficiente para poder continuar dividiéndose 12 días después del cambio de medio, a diferencia de lo que se observó en las células control.

Para analizar con mayor profundidad los efectos de las dosis IC₅₀ para la Doxorubicina y la WP631 sobre la línea MCF-7/VP, se realizaron cuatro tipos de experimentos: ensayo clonogénico, recuento de viabilidad, análisis de proliferación usando CFSE, y análisis de la distribución del ciclo celular a tiempos largos, que se explican a continuación.

Figura R3. Alteraciones en la distribución del ciclo celular a lo largo del tiempo inducidas por la Daunorubicina, la Doxorubicina y la WP631, sobre las líneas Jurkat T (A), MDA-MB-231 (B) y MCF-7/VP (C). La distribución del ciclo celular se determinó mediante la tinción con yoduro de propidio de las células y su posterior análisis en un citómetro de flujo. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes, con resultados similares.

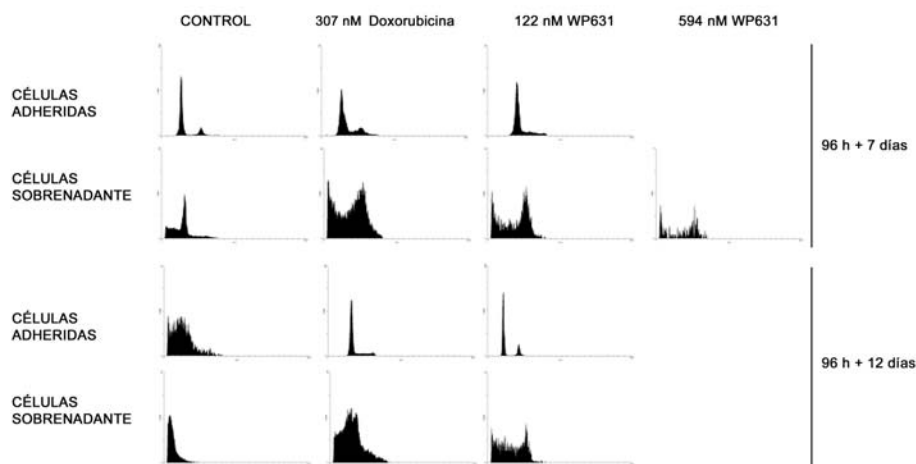


Figura R4. Distribución del ciclo celular de las células MCF-7/VP tratadas con 307 nM Doxorubicina, 122 nM WP631, 594 nM WP631 o sin tratar. Se realizaron tratamientos continuos de 96 horas y se analizó la distribución del ciclo de las células que crecían adheridas al frasco (viables) y de las células del sobrenadante (inviabiles en su gran mayoría), tras siete y doce días de haber retirado los fármacos del medio de cultivo.

Tras los tratamientos continuos durante 96 horas con las dosis correspondientes de cada fármaco, se incubaron las células con medio fresco durante 27 días (ver Materiales y Métodos). Pasados los 27 días, se realizó el recuento de células vivas y muertas, y un ensayo clonogénico (determinación de la capacidad de las células de formar colonias y, por lo tanto, de proliferar) mediante una tinción con azul de tripano. Los cultivos tratados con 307 nM Doxorubicina ó 122 nM WP631, el número de células vivas fue comparable a las células control, 27 días después de haber retirado los fármacos del medio de cultivo (Tabla R3). Este resultado confirma que la subpoblación resistente de células tratadas crecía con normalidad y que su tasa de división era la misma que la de las células MCF-7/VP sin tratar. El recuento de células muertas demostró que los tratamientos no provocaron un incremento de la muerte celular, ya que esta fue inferior al 4% tanto en los cultivos tratados como en el cultivo control (Tabla R3). En todos los cultivos analizados, tanto en los tratamientos como en el control, el número de células por colonia fue siempre superior a 50. Este resultado indica que los tratamientos no afectaron la capacidad de las células supervivientes de formar colonias (clonogenicidad) y que, por lo tanto, no interferían con la capacidad de proliferación de las células. Después de realizar estos experimento, las células tratadas y control se replaquearon por triplicado, a una densidad de 1×10^6 células por placa, para realizar una tinción con CFSE, una tinción con yoduro de propidio y, un nuevo ensayo de formación

de colonias y viabilidad, 3 días más tarde. La Tabla R3 muestra como, 30 días después de haber eliminado los fármacos del medio, la capacidad de formar colonias, la tasa de división celular y viabilidad de las células tratadas siguió sin diferir de las células sin tratar.

La Figura R5A muestra que a los 30 días de haber eliminado los fármacos del medio, los cultivos correspondientes a los tratamientos mostraban una distribución de las fases del ciclo celular equivalente a las células control. Cuando las células teñidas con CFSE se dividen, reparten de manera equitativa el colorante a sus células hijas, resultando en la reducción de la fluorescencia media cuando se analizan las células en un citómetro de flujo (Materiales y Métodos). Por el contrario, las células que han dejado de proliferar resultan en la obtención de valores altos de fluorescencia, cuando se analizan en un citómetro. Los resultados obtenidos con la tinción con CFSE (Figura R5B) confirmaron que, efectivamente, las células tratadas con las dosis IC₅₀ para la Doxorubicina o la WP631, habían recuperado la capacidad de proliferar normalmente ya que, igual que el control, estos tratamientos resultaron en picos de fluorescencia baja.

Tabla R3. Recuento de células, mediante la tinción con azul de tripano, en cultivos de células MCF-7/VP tratados con 307 nM ó 122 nM WP631, o sin tratar (control). Se determinó el número de células vivas y muertas en cada caso, así como el número de colonias con más de 50 células, con respecto al número total de colonias (ensayo clonogénico). Se indican los valores promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

27 DÍAS	CONTROL	307 nM Doxorubicina	122 nM WP631
Vivas	4,1 ($\pm 0,4$) x 10 ⁶	4,0 ($\pm 0,5$) x 10 ⁶	3,4 ($\pm 0,3$) x 10 ⁶
Muertas	1,1 ($\pm 0,1$) x 10 ⁵	9,8 ($\pm 0,1$) x 10 ⁴	9,6 ($\pm 3,8$) x 10 ⁴
% Viabilidad	97,5 \pm 9,5	97,6 \pm 11,2	97,2 \pm 8,3
% (colonias > 50 células)/número de colonias	100	100	100

30 DÍAS	CONTROL	307 nM Doxorubicina	122 nM WP631
Vivas	8,9 ($\pm 0,6$) x 10 ⁶	7,9 ($\pm 0,8$) x 10 ⁶	9,0 ($\pm 0,4$) x 10 ⁶
Muertas	2,7 ($\pm 1,9$) x 10 ⁵	5,5 ($\pm 1,3$) x 10 ⁵	4,4 ($\pm 1,6$) x 10 ⁵
% Viabilidad	97,1 \pm 6,3	93,9 \pm 8,9	95,4 \pm 4,3
% (colonias > 50 células)/número de colonias	100	100	100

Los resultados que se presentan en la tabla R3 y en la Figura R5 demuestran, en conjunto, que las dosis 307 nM Doxorubicina y 122 nM WP631 (dosis IC₅₀) no afectaron la proliferación ni indujeron la muerte de las células MCF-7/VP. Estos resultados confirman que las células MCF-7/VP son resistentes estas dosis.

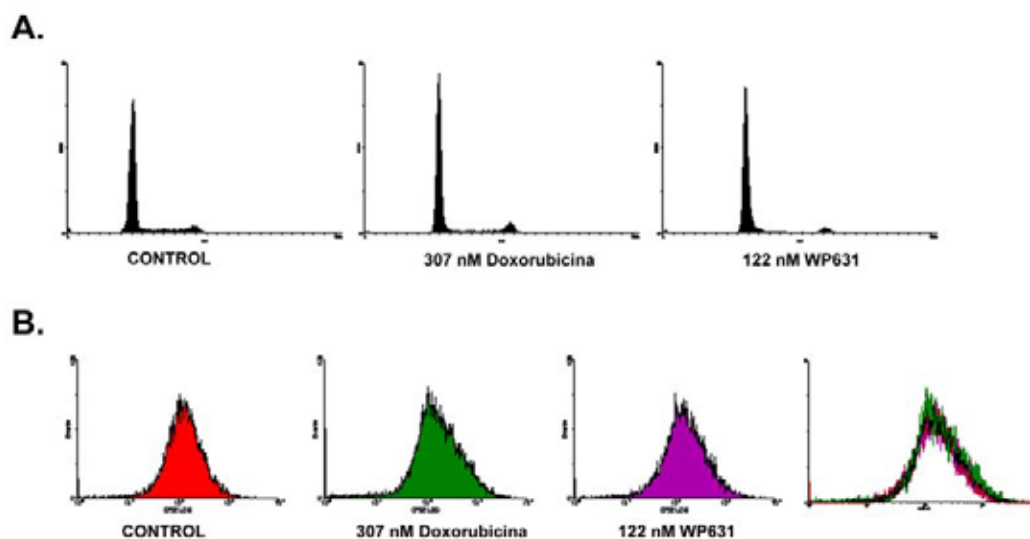


Figura R5. Análisis de la distribución del ciclo celular (A) y tinción con CFSE (B). Las células MCF-7/VP tratadas con 307 nM Doxorubicina ó 122 nM WP631, o sin tratar (control) durante 96 horas, se tiñeron con yoduro de propidio o CFSE después de 30 días para comparar la distribución del ciclo celular y la capacidad de proliferación de las células tratadas, con respecto a las células sin tratar. Se realizaron tres experimentos independientes y se obtuvieron resultados similares.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE ANTRACICLINAS

Para determinar si las diferentes respuestas observadas se debían a diferencias en la capacidad de las líneas celulares de capturar cada uno de los fármacos, se cuantificó la absorción celular de las Antraciclina a lo largo del tiempo. Aprovechando que el cromóforo presente en la estructura de las Antraciclina emite fluorescencia cuando se excita a determinada longitud de onda, utilizamos un espectrofluorímetro para cuantificar la acumulación intracelular de los fármacos (Materiales y Métodos). La determinación de la acumulación de fármacos se realizó sobre lisados celulares obtenidos a partir de cultivos tratados con Daunorubicina, Doxorubicina o WP631. Para simplificar el análisis los cultivos se trataron únicamente con las dosis IC₇₅ determinadas en cada caso, asumiendo que las cinéticas de incorporación de los

fármacos utilizados en sus dosis IC_{50} deberían ser proporcionales y equivalentes. Excepcionalmente, se cuantificó la acumulación intracelular de la WP631 en las células MCF-7/VP tratadas con las dos dosis, IC_{50} e IC_{75} , debido a las diferencias en cuanto a sensibilidad que se han expuesto anteriormente. Se determinó la acumulación absoluta de cada fármaco con el tiempo (medida en $ng/1 \times 10^7$ células viables) y la acumulación relativa de la WP631 con respecto a la Daunorubicina o la Doxorubicina (Figura R6).

Las cinéticas de entrada de la Daunorubicina y la WP631 en las células JurkaT T fueron muy diferentes (Figura R6A). La acumulación intracelular de Daunorubicina a las 4 horas de tratamiento fue unas cinco veces superior a la de la WP631. Se puede observar que la entrada máxima de Daunorubicina al interior de las células tuvo lugar a las 4 horas de tratamiento, ya que su concentración intracelular no aumentó con el tiempo (48 y 72 horas) e incluso, parecía reducirse (Figura R6A). Consideramos que, más que una reducción en la acumulación de Daunorubicina, lo que sucedía era que, al aumentar la cantidad de células muertas con el tiempo, había una mayor cantidad de restos celulares y DNA en el medio, que podían actuar “secuestrando” moléculas de Daunorubicina, impidiendo que estas entraran en las células que aún permanecían viables. Se pudo observar también que la incorporación de WP631 aumentó, aproximadamente, dos veces a las 48 horas de tratamiento, alcanzando unos valores de fármaco intracelular que se mantuvieron constantes hasta las 72 horas de tratamiento continuo. A pesar de que la máxima acumulación de WP631 tuvo lugar a partir de las 48 horas, la cantidad de Daunorubicina incorporada continuaba siendo superior (más de dos veces). De estos resultados se puede deducir que la Daunorubicina penetra más eficazmente que la WP631 en el interior de las células Jurkat T.

A diferencia de las células Jurkat T, en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7/VP, los fármacos empezaron a acumularse significativamente en el interior de las células a partir de las 24 horas de tratamiento (Figuras R6B y R6C).

La Figura R6B muestra las cinéticas de acumulación de la Doxorubicina y la WP631 en las células MDA-MB-231. Se puede observar que tras 24 horas de tratamiento con $2 \mu M$ Doxorubicina ó 157 nM WP631, la cantidad de intracelular de ambos fármacos fue comparable. Sin embargo, a partir de las 24 horas, la cinética de incorporación de la WP631, comparada con la de la Doxorubicina fue muy distinta. Por un lado, la cantidad de Doxorubicina que incorporaron las células, tras 48 horas de tratamiento, aumentó unas seis veces con respecto a las 24 horas, valor que no aumentó

significativamente a las 96 horas de tratamiento continuo. Por lo tanto, la acumulación máxima de la Doxorubicina tuvo lugar a partir de las 48 horas de tratamiento continuo. Por otro lado, se puede observar que la cantidad de WP631 que absorbieron las células MDA-MB-231 no aumentó con el tiempo, por lo que se puede considerar que la acumulación intracelular de la WP631 fue máxima a partir de las 24 horas de tratamiento. A partir de esos resultados concluimos que la Doxorubicina se incorpora en las células MDA-MB-231 con mayor eficiencia que la WP631.

La Figura R6C muestra los resultados de las cinéticas de absorción de la Doxorubicina y la WP631 en las células MCF-7/VP. Mientras que la cantidad de Doxorubicina que se acumuló en las células no varió con el tiempo, la cinética de acumulación de la WP631 dependía de la dosis utilizada. A las 24 horas de tratamiento continuo con 594 nM WP631 (IC_{75}), la cantidad de fármaco acumulado fue muy superior a las concentraciones de Doxorubicina o WP631 presentes en las células tratadas con 307 nM Doxorubicina (IC_{50}), o una dosis menor de WP631 (122 nM, IC_{50}), que fueron comparables entre sí. Sin embargo, tras 48 horas de tratamiento con WP631, la concentración de fármaco en el interior de las células fue aproximadamente la misma, independientemente de las dosis utilizada (594 nM ó 122 nM), y cerca de 20 veces superior a la cantidad de Doxorubicina intracelular. Cuando se determinó la acumulación de los fármacos a las 96 horas de tratamiento, observamos que en las células MCF-7/VP tratadas con 594 nM WP631 ésta fue casi 5 veces superior respecto a las 48 horas. Sin embargo, cuando se trataron las células con 122 nM WP631, la cantidad de fármaco acumulado en las células se redujo unas 4 veces con respecto a las 48 horas, y era muy parecida a la Doxorubicina acumulada a las 96 horas de tratamiento, cuya entrada al interior de las células no aumentó desde las 24 horas. Como se puede observar en la Figura R6C, la acumulación de WP631 en células tratadas con una dosis de 594 nM fue casi 100 veces superior a la Doxorubicina y a la WP631 intracelulares, en células tratadas con 122 nM WP631. De estos resultados se deduce que la WP631 se acumuló en las células MCF-7/VP más eficientemente que la Doxorubicina. Sin embargo, dependiendo de la dosis usada, la concentración intracelular de la Bisantraciclina aumentó con el tiempo (dosis IC_{75}), o bien fue expulsada por las células (dosis IC_{50}). Este resultado explica porqué las células MCF-7/VP respondieron únicamente al tratamiento con las dosis IC_{75} para la WP631 y fueron

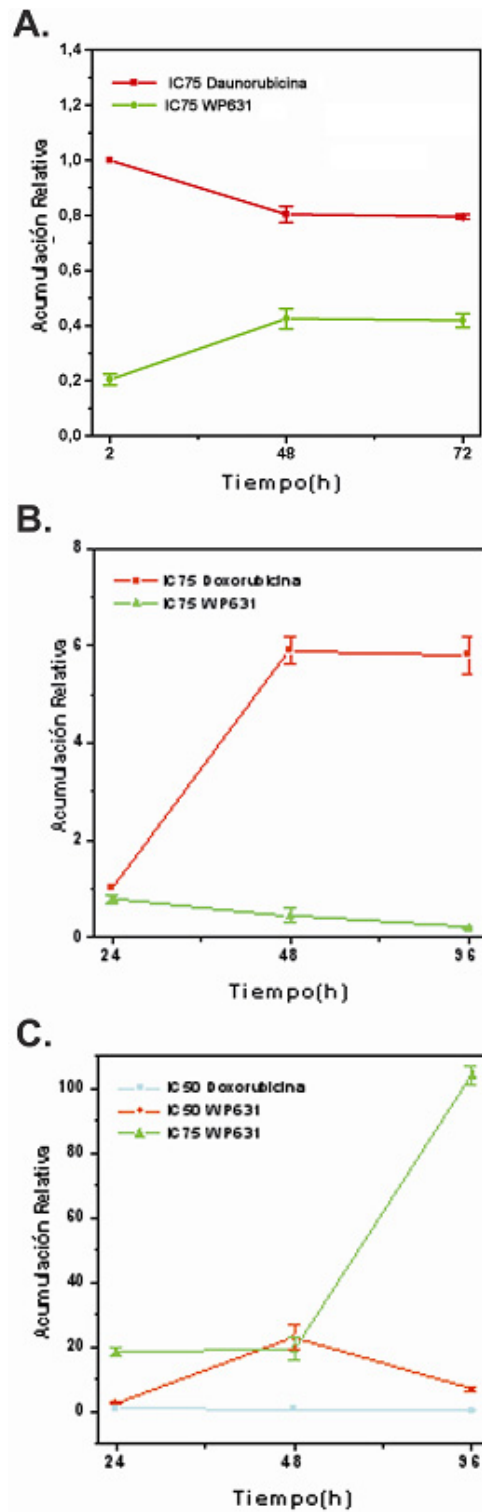


Figura R6. Cinéticas de absorción de la Daunorubicina y la WP631 en células Jurkat T (A), y de la Doxorubicina y la WP631 en células MDA-MB-231 (B) o MCF-7/VP (C). Se representa el valor promedio de la acumulación intracelular de la WP631 (ng WP631/ 10^7 células), respecto a la acumulación de Daunorubicina o Doxorubicina (ng / 10^7 células), y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

resistentes al tratamiento con las dosis IC_{50} para la Doxorubicina o la WP631 (307 nM y 122 nM, respectivamente) (Tabla R2, Figuras R3 y R4).

A partir de los resultados de los experimentos de acumulación se concluye que en las líneas celulares que no presentan resistencia múltiple a antitumorales (Jurkat T y MDA-MB-231), la acumulación de la WP631 es claramente inferior a la cantidad de Daunorubicina o Doxorubicina. A partir de los resultados presentados en la Tabla R1, se deduce que no sólo se requieren menores concentraciones de WP631 que de Daunorubicina o Doxorubicina para inhibir el crecimiento de estas células, sino que la cantidad de fármaco efectiva (las moléculas que se encuentran en el interior de las células) para ejercer este efecto es mucho menor. Por otro lado, la línea celular MCF-7/VP, que presenta fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*) es capaz de acumular únicamente la WP631, y no Doxorubicina, pero dependiendo de la dosis de WP631 utilizada (Figura R6C).

RII. LAS ANTRACICLINAS PERMITEN ANALIZAR MECANISMOS DE MUERTE CELULAR NO-APOPTÓTICA, DE INTERÉS EN LA TERAPIA ANTITUMORAL

4.5. ANÁLISIS DE LA SENESCENCIA CELULAR INDUCIDA POR ANTRACICLINAS

Para comprobar si aquellos tratamientos que habían provocado la parada del ciclo celular en la fase G_2/M (Figura R3) se asociaban a la inducción de senescencia celular, se determinó la actividad SA- β -galactosidasa lisosomal a pH 4.0 y 6.0 (Materiales y Métodos). En todos los casos (tanto las células tratadas con las diferentes Antraciclinas y dosis, como las células sin tratar) detectamos actividad enzimática a pH 4.0. Sin embargo, sólo las células Jurkat T tratadas con 91 nM Daunorubicina ó 60 nM WP631 (valores IC_{50} e IC_{75} calculados a las 72 horas, respectivamente) presentaron actividad SA- β -gal lisosomal a pH 6.0, coincidiendo con el momento en que la mayoría de las células se estaban acumuladas en G_2/M (Figura R7). Aproximadamente el 40% de las células tratadas con 91 nM Daunorubicina y cerca del 50% de las células tratadas con 60 nM WP631 fueron capaces de procesar el sustrato X-gal a pH 6.0.

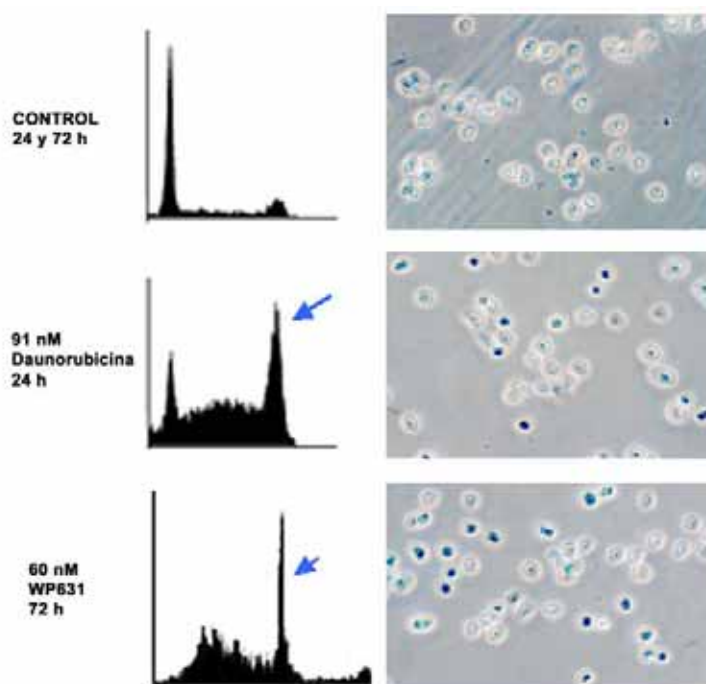


Figura R7. Determinación de la actividad SA- β -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 en células Jurkat tratadas con 91 nM Daunorubicina, 60 nM WP631 o sin tratar. Se realizaron las tinciones en el momento en que cada tratamiento inducía la acumulación de las células en G2/M (a las 24 horas para la Daunorubicina y a las 72 horas en el caso de la WP631), según los resultados presentados en la Figura R3.

Dado que las células senescentes presentan actividad enzimática SA- β -gal a pH 6.0 y no sintetizan DNA (véase Introducción), se determinó también la capacidad de síntesis de DNA en células Jurkat T tratadas con 91 nM Daunorubicina ó 60 nM WP631 durante 24 ó 72 horas, respectivamente. Las células sin tratar (control), sintetizaban DNA a lo largo de todos los tiempos analizados (4, 24 y 72 horas), ya que se trata de células que proliferan con normalidad (Figura R8). Tras 4 horas de tratamiento con 91 nM Daunorubicina ó 60 nM WP631, momento en que la distribución de las fases del ciclo celular era comparable a la distribución de las células control (Figura R3), la capacidad de síntesis de DNA de las células tratadas fue comparable a la de las células sin tratar. Sin embargo, las células tratadas con 91 nM Daunorubicina dejaron de sintetizar DNA después de 24 horas (Figura R8). Por el contrario, en las células tratadas con 60 nM WP631 durante 72 horas la capacidad de síntesis de DNA no estaba inhibida (Figura R8).

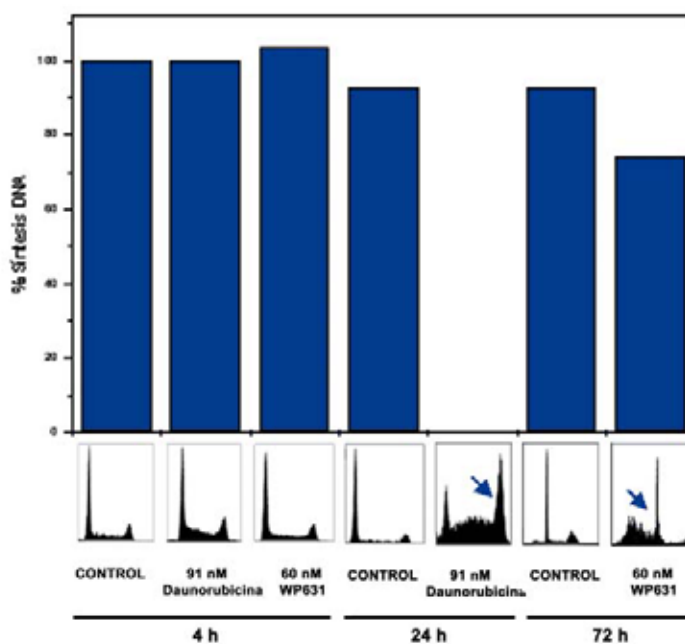


Figura R8. Determinación de las síntesis de DNA, mediante la medida de la incorporación de BrdU, en células Jurkat T tratadas con 91 nM Daunorubicina durante 4 y 24 horas, con 60 nM WP631 durante 4 y 72 horas, o sin tratar. Los resultados se expresan como de porcentaje de síntesis de DNA respecto a las células sin tratar, que representan el 100% de la síntesis.

A partir de estos resultados se deduce que el tratamiento de las células Jurkat T con 91 nM Daunorubicina indujo la senescencia celular a partir de las 24 horas, ya que en ese momento, se detectó actividad SA- β -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 y las células no sintetizaban DNA. Sin embargo, aunque las células tratadas con 60 nM WP631 fueron positivas para el marcador de senescencia SA- β -gal a pH 6.0 a las 72 horas de tratamiento, estas células sintetizaban DNA. Este último resultado podría explicar, al menos en parte, la aparición de células poliploides tras el tratamiento (Figura R3), si bien nos hacía descartar a su vez, que el tratamiento con WP631 indujera la senescencia celular. Podría ser, que el tratamiento con 60 nM WP631 estuviera induciendo un proceso de *crisis*, caracterizado porque las células presentan actividad SA- β -gal a pH 6.0 pero sintetizan DNA (véase Introducción). Las células en *crisis* se encuentran en un estado de “no-proliferación” debido al balance entre la proliferación de células con aberraciones cromosómicas y poliploidías, y la muerte de las mismas, aspectos que coinciden con los resultados obtenidos con la WP631 (Figuras R3, R9, R13 y R14).

4.6. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA CATÁSTROFE MITÓTICA

Se analizaron en profundidad las características morfológicas de las células poliploides derivadas de algunos de los tratamientos (Figura R3). Para ello utilizamos un LSC (*Laser scanning Cytometer*). Se trata de un citómetro que analiza la distribución del ciclo celular de células teñidas con yoduro de propidio, dispuestas sobre portaobjetos. El LSC permite trabajar con pequeños volúmenes de muestra y obtener imágenes de las células presentes en cada pico, en función a la intensidad de la fluorescencia emitida. Se ajustaron los parámetros, de manera que el LSC pudiera detectar, además del pico correspondiente a células 8n, picos de células con ploidía superior.

• Línea celular Jurkat T

El tratamiento durante 72 horas de las células Jurkat T con 60 nM WP631, indujo la formación de células poliploides (Figura R3). Mediante el uso del LSC, comprobamos que este tratamiento inducía la aparición de diferentes picos de células poliploides, atendiendo a su contenido en DNA: 8n, 16n, etc (Figura R9). La mayoría de las células poliploides tenían un contenido en DNA de 8n, representando entre el 3 y el 6% del total de la población. La Figura R9 muestra que la mayoría de las células 8n eran células multinucleadas, aunque se detectó la presencia de una minoría de células 8n con uno o dos núcleos.

En conjunto, nuestros resultados confirman que el tratamiento de las células Jurkat T con 60 nM WP631 inducía *crisis* celular (Figuras R7 y R8), proceso que, de acuerdo con lo descrito por Shay y Wright, culmina con la muerte por catástrofe mitótica (Shay and Wright, 2004).

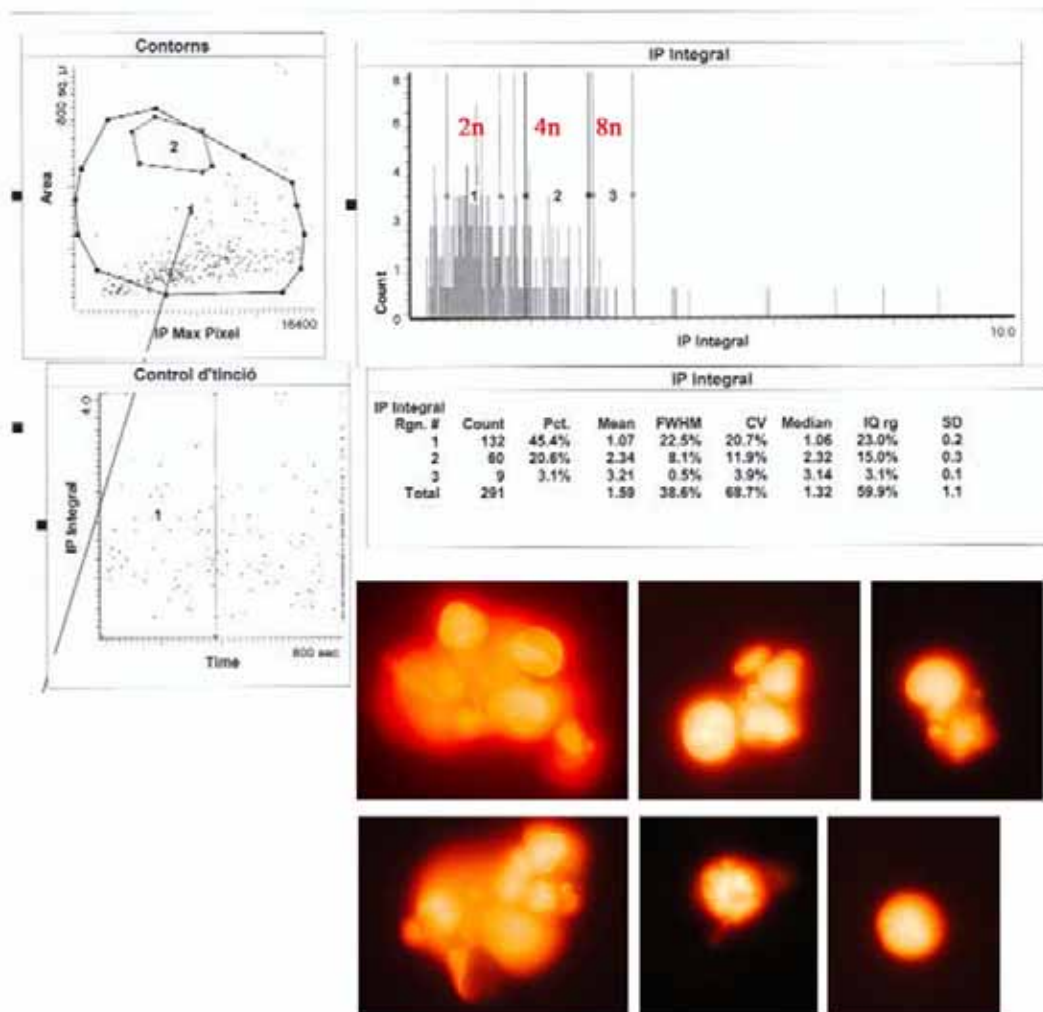


Figura R9. Análisis de LSC de las células Jurkat T tratadas con 60 nM WP631 durante 72 horas. Se muestra la distribución del ciclo celular y la morfología de las células presentes en el pico 8n. El experimento se repitió tres veces y se obtuvieron resultados similares.

• Línea celular MDA-MB-231

Según los resultados de citometría de flujo presentados en la Figura R3, las dosis IC_{75} para la Doxorubicina y la WP631 (2 μ M y 157 nM respectivamente) indujeron también el desarrollo de poliploidías en las células MDA-MB-231. La Figura R10 muestra los resultados de la distribución del ciclo celular y la morfología de las células poliploides, tras 96 horas de tratamiento con Doxorubicina o WP631. Después de 96 horas de tratamiento continuo con 2 μ M Doxorubicina, la mayoría de las células poliploides (aproximadamente el 14% del total de la población) tenían una dotación 8n, aunque también encontramos células 16n (aproximadamente un 8%) (Figura R10A). Las imágenes obtenidas con el LSC demostraron que el tratamiento de las células MDA-

MB-231 con 2 μ M Doxorubicina indujo la formación de células poliploides con un solo núcleo, con dotaciones de 8n o múltiplos (Figura R10A).

El tratamiento con 157 nM WP631 durante 96 horas provocó la acumulación de ~36% de las células en la fase G₂/M y la presencia de más de un 35% de células poliploides (Figura R10B). La mayoría de las células poliploides tenían un contenido de DNA 8n, representando ~32% del total de las células. En este caso, las células poliploides derivadas del tratamiento con WP631 podían contener uno, dos o múltiples núcleos (Figura R10B).

A partir de los resultados del análisis de mortalidad celular (Tabla R2), de la distribución del ciclo celular (Figura R3) y la determinación de la actividad SA- β -gal a pH 6.0 (ver apartado 4.5.), se puede concluir que, tanto el tratamiento de las células MDA-MB-231 con Doxorubicina, como con WP631, induce la muerte por catástrofe mitótica, que en este caso parece ser independiente de procesos de senescencia o *crisis* celular.

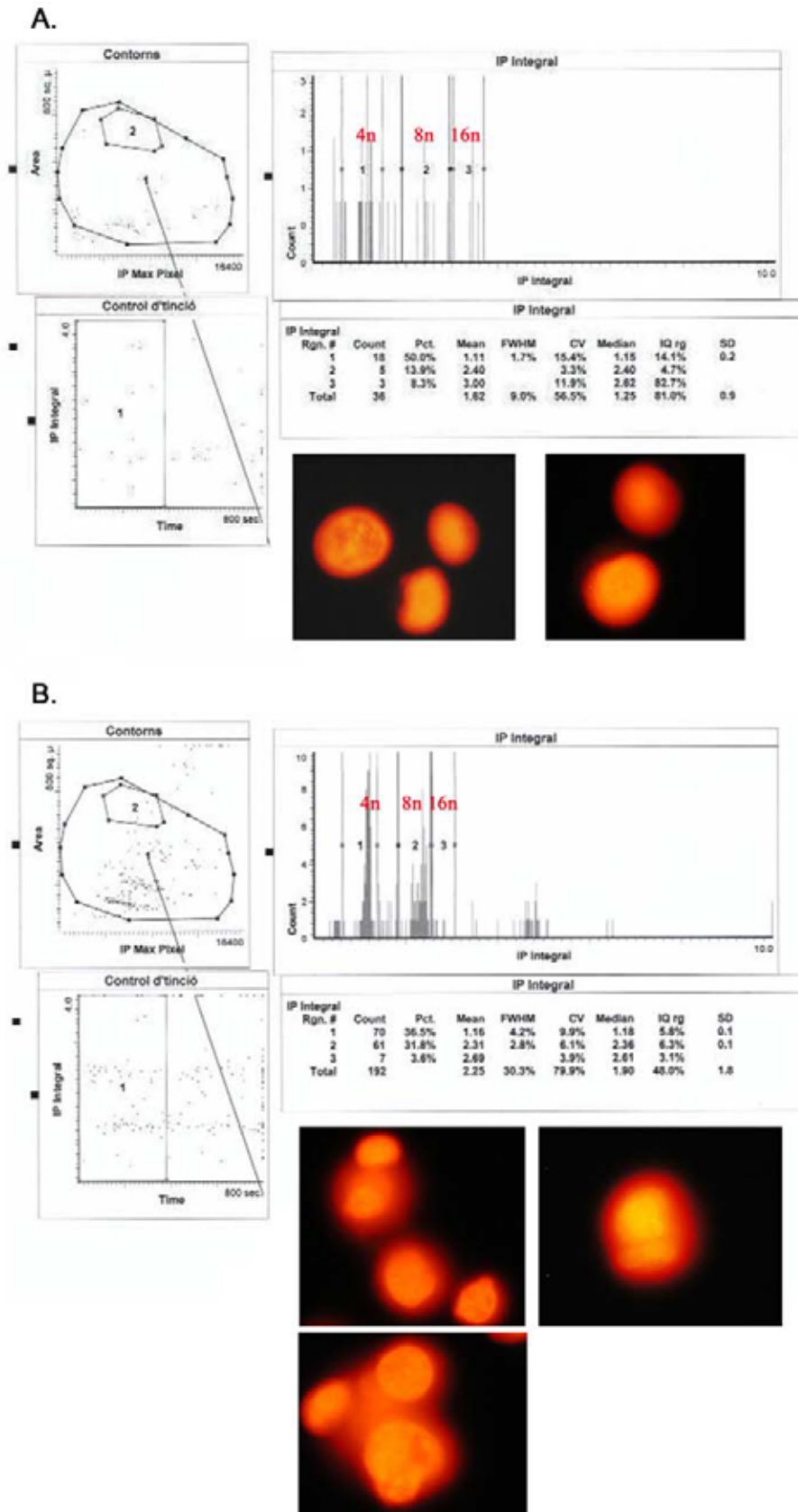


Figura R10. Análisis de LSC de las células MDA-MB-231 tratadas con 2 μ M Doxorubicina (A) ó 157 nM WP631 (B) durante 96 horas. Se muestra la distribución del ciclo celular y la morfología de las células presentes en los picos 8n. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

● Línea celular MCF-7/VP

En la Figura R11 se muestran los resultados obtenidos con el LSC de células MCF-7/VP tratadas con 594 nM WP631 (IC_{75}) durante 96 horas, tres días después de haber cambiado el medio de cultivo. Se trata del único tratamiento que consiguió inducir la muerte de las células MCF-7/VP (Tabla R2). Se detectó más de un 68% de células con dotación 8n y más de un 15% de células 16n. Se pudo observar que la gran mayoría de células 8n contenían uno o dos núcleos (Figura R11). Los resultados obtenidos confirmaron que la catástrofe mitótica era el mecanismo de muerte principal derivado del tratamiento de las células MCF-7/VP con 594 nM WP631. Según resultados previos (ver apartado 4.5.), la muerte por catástrofe mitótica en este caso era independiente a la inducción de procesos de senescencia o *crisis* celular (Tabla R2, Figura R3 y apartado 4.5.).

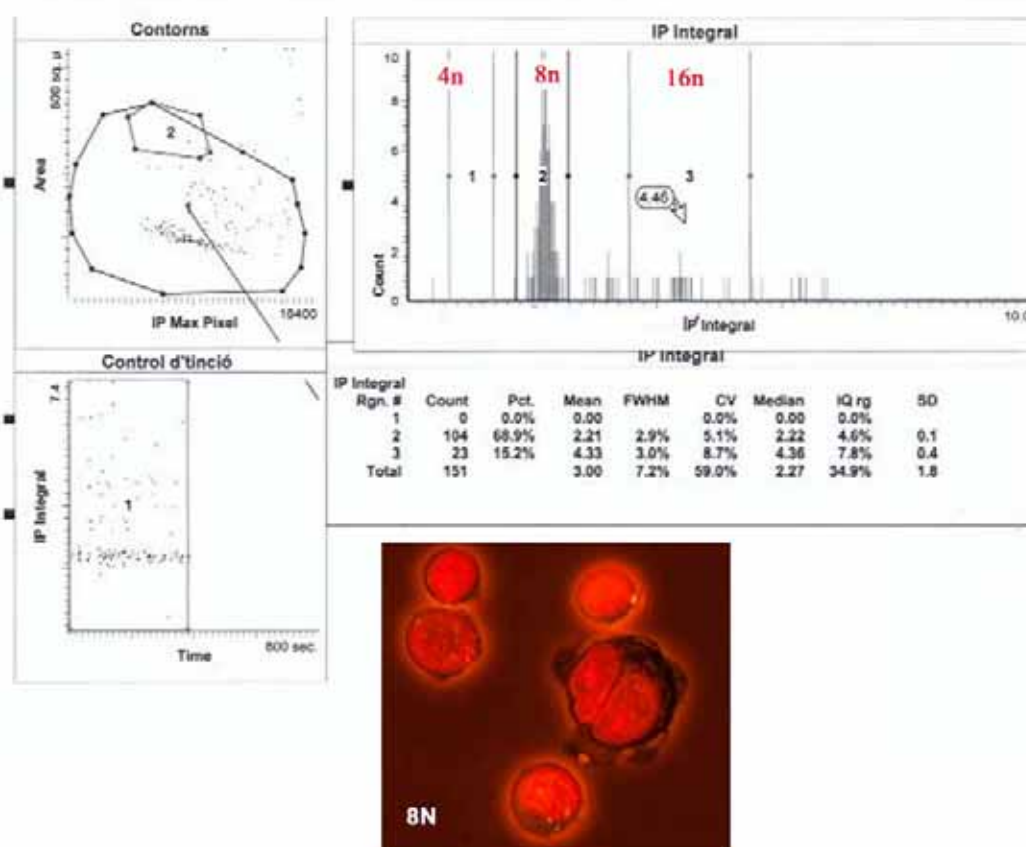


Figura R11. Análisis de LSC de las células MCF-7/VP tratadas 594 nM WP631 durante 96 horas, 3 días después del cambio de medio. Se muestra la distribución del ciclo celular y la morfología de las células presentes en los picos 8n. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Aunque detectamos la presencia de una subpoblación de células MCF-7/VP resistente a los tratamientos con 307 nM Doxorubicina ó 122 nM WP631 (dosis IC_{50} de los fármacos) (Tablas R2 y R3 y Figuras R3 y R4), llamó la atención que el tratamiento con Doxorubicina indujera también la formación de células poliploides, después de 96 horas de tratamiento continuo (Figura R3). A pesar de esto, las células se recuperaron y continuaron proliferando con normalidad 7 días después de haber eliminado el fármaco del medio de cultivo (Figuras R3 y R4). Se analizó la morfología de las células poliploides derivadas de este tratamiento con el LSC. La Figura R12 muestra los resultados obtenidos a los tres días de haber cambiado el medio de cultivo, momento en que se detectó un gran número de células poliploides (Figura R3). Se observó cerca del 18% de células con una dotación de DNA de $8n$ y más de 2% de células $16n$. El análisis morfológico de las células $8n$ reveló que se trataba, en su gran mayoría, de células multinucleadas (Figura R12).

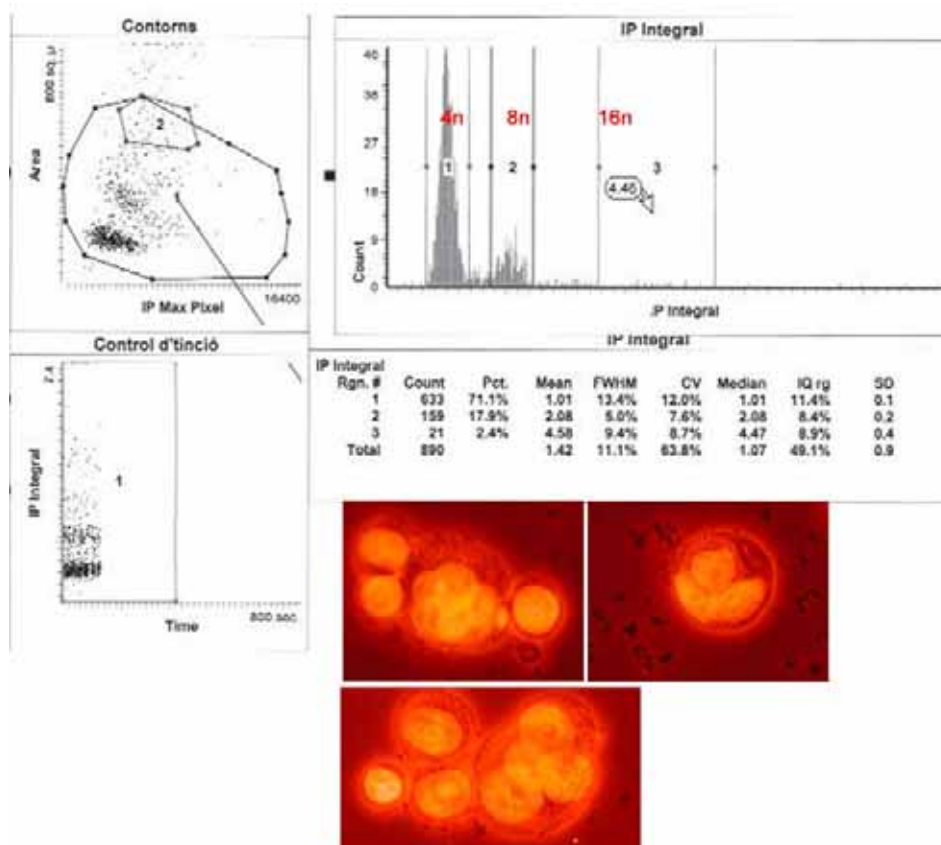


Figura R12. Análisis de LSC de las células MCF-7/VP tratadas con 307 nM Doxorubicina durante 96 horas. Se muestra la distribución del ciclo celular y la morfología de las células presentes en los picos $8n$. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. Las células multinucleadas completaron la mitosis después de una semana de haber retirado el fármaco del medio, proliferando con normalidad (Figura R3).

Estos resultados demuestran que la catástrofe mitótica es un proceso de muerte celular que puede tener lugar de manera dependiente e independiente de la *crisis* celular y que se caracteriza por la formación de células poliploides, con uno o más núcleos (Figuras R3, R9, R10 y R11). Sin embargo, la detección de células poliploides no implica un signo inequívoco de catástrofe mitótica ya que, en algunos casos, estas células parecen superar el estado de poliploidía, completando la mitosis, y manteniendo su potencial oncogénico (Figuras R3 y R12).

4.7. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS DURANTE LA CATÁSTROFE MITÓTICA

A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis con LSC, nos planteamos realizar tinciones cromosómicas con el fin de analizar más detalladamente las aberraciones mitóticas que se producen durante la catástrofe mitótica (Roninson et al., 2001). Las tinciones se realizaron en el momento en que los tratamientos indujeron la formación de células poliploides. Merece la pena resaltar que, aunque detectamos la presencia de figuras mitóticas anormales en todos los casos asociados a muerte por catástrofe mitótica, los resultados más espectaculares se obtuvieron con las células Jurkat T. Esto se debe a que solamente el tratamiento de las células Jurkat T con WP631 indujo la formación de células poliploides que eran mayoritariamente multinucleadas, permitiendo observar con mayor facilidad las diferentes figuras mitóticas.

En la Figura R13 se muestran los resultados obtenidos para las células Jurkat T tratadas durante 72 horas con 60 nM WP631 o sin tratar (control). Se observó que las células control se encontraban mayoritariamente en interfase, aunque algunas células se estaban dividiendo. La Figura R13 muestra varios ejemplos de células sin tratar en profase y metafase aparentemente normales. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos con el citómetro de flujo, que demostraron que las células sin tratar se encontraban, a las 72 horas, acumuladas en la fase G₁ (interfase), mientras que el porcentaje de células en mitosis (pico G₂/M) era reducido (Figura R3). Por otro lado, la Figura R13 muestra las estructuras cromosómicas obtenidas a partir de células Jurkat T tratadas durante 72 horas con 60 nM WP631 (momento en que detectamos la presencia de células poliploides multinucleadas -Figuras R3 y R9-). A diferencia de las células control, detectamos un mayor número de células que se estaban dividiendo, confirmándose los resultados del análisis de la distribución del ciclo celular mostrados

en la Figura R3, donde el porcentaje de células en mitosis fue superior al de las células sin tratar. En la Figura R13 se pueden observar algunos ejemplos de células tratadas con WP631 que se dividían con numerosas aberraciones cromosómicas. Se muestran ejemplos de profases aberrantes, donde el número de cromosomas parecía superar la ploidía normal de las células, y que se encontraban dispersos dentro del núcleo. Estas figuras de profases aberrantes son conocidas como C-mitosis (Roninson et al., 2001). Por otro lado, observamos diversas células en metafase con alineaciones incorrectas de los cromosomas o, incluso, que presentaban más de dos polos. En la Figura R13 se muestran también ejemplos de anafases multipolares, que darían lugar a la formación de células multinucleadas como las mostradas en la Figura R9. Estos resultados confirman que la catástrofe mitótica es el mecanismo responsable de la muerte celular en los tratamientos asociados a la acumulación de células con contenido en DNA de $4n$, $8n$, o ploidías superiores.

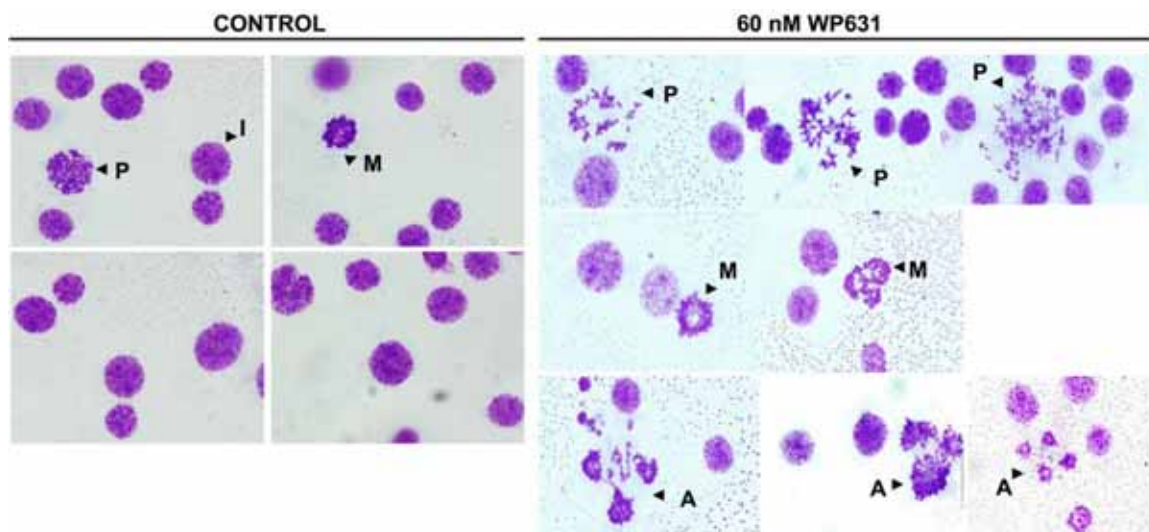


Figura R13. Tinción de los cromosomas de células Jurkat T control o tratadas durante 72 horas con 60 nM WP631. La mayoría de las células control estaban en interfase (I), mientras que algunas se encontraban en las diferentes fases de la mitosis: se muestran ejemplos de profases (P) y metafases (M). Las figuras mitóticas observadas en las células control eran normales. El tratamiento con WP631 inducía figuras mitóticas aberrantes: C-mitosis o profases aberrantes (P), metafases con cromosomas incorrectamente alineados (M) y anafases multipolares (A). Tinción realizada con la solución de Leishman y fotografiada con una amplificación de 1000 x.

4.8. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS Y NECROSIS

En función a los resultados obtenidos, se analizó si la muerte de las células senescentes tiene lugar por apoptosis o por necrosis. Por otro lado, decidimos explorar si, tal y como se ha descrito, catástrofe mitótica y apoptosis comparten características morfológicas (Chan et al., 1999). Se analizaron los patrones de tinción con Anexina-V y yoduro de propidio asociados a cada tratamiento para diferenciar las células viables, apoptóticas y necróticas (Materiales y Métodos). Comparamos los patrones de tinción de las células apoptóticas (tomando como control las células Jurkat T tratadas con 182 nM Daunorubicina -IC₇₅-) con las células muertas por catástrofe mitótica.

La Figura R14A muestra los resultados de citometría de flujo obtenidos para las células Jurkat T. Aunque en las células control (sin tratar) siempre se observó un pequeño porcentaje de muerte celular, la fracción de células viables fue muy elevada durante todos los tiempos analizados. El tratamiento de las células con 182 nM Daunorubicina (IC₇₅) provocó el aumento del porcentaje de células apoptóticas entre las 4 y las 24 horas (Figura R14A). A las 4 horas de tratamiento, el porcentaje de células apoptóticas superaba el porcentaje de células necróticas, pero la proporción de las dos poblaciones se igualó tras 24 horas de tratamiento (25% de células apoptóticas y 20% de células necróticas). Al tratarse de células en cultivo, las células apoptóticas no se pueden eliminar por fagocitosis, sino que acaban reventando y liberando su contenido al medio, fenómeno que se conoce como apoptosis secundaria. El patrón de tinción doble con Anexina-V y yoduro de propidio es el mismo en las células apoptóticas secundarias y necróticas. Dado que primero aumentó el número de células apoptóticas y después el de células necróticas, probablemente no se trata de necrosis inducida por fármacos, sino de apoptosis secundaria. Se puede concluir que el tratamiento de las células Jurkat T con la IC₇₅ para la Daunorubicina induce mayoritariamente la muerte por apoptosis desde las 4 horas de tratamiento.

El tratamiento de las células Jurkat T con 91 nM Daunorubicina (~IC₅₀), provocó un ligero aumento de las células apoptóticas entre las 4 y las 24 horas (de 5.2% a 7.9%), que se acentuó a las 48 horas de tratamiento continuo, llegando al 24.12% (Figura R14A). El porcentaje de células necróticas y/o apoptóticas secundarias también aumentó con el tiempo, representando el 65% respecto al total de la población celular analizada a las 48 horas de tratamiento. El aumento de las células necróticas fue paralelo al aumento de las células apoptóticas desde el primer momento, lo que sugiere que

probablemente las células necróticas no eran, en este caso, el resultado de procesos de apoptosis secundaria. La necrosis podía ser el destino final de las células senescentes mostradas en la Figura R7 y (Seluanov et al., 2001). De este resultado se puede concluir que el tratamiento con 91 nM Daunorubicina induce paralelamente apoptosis y senescencia en las células Jurkat T.

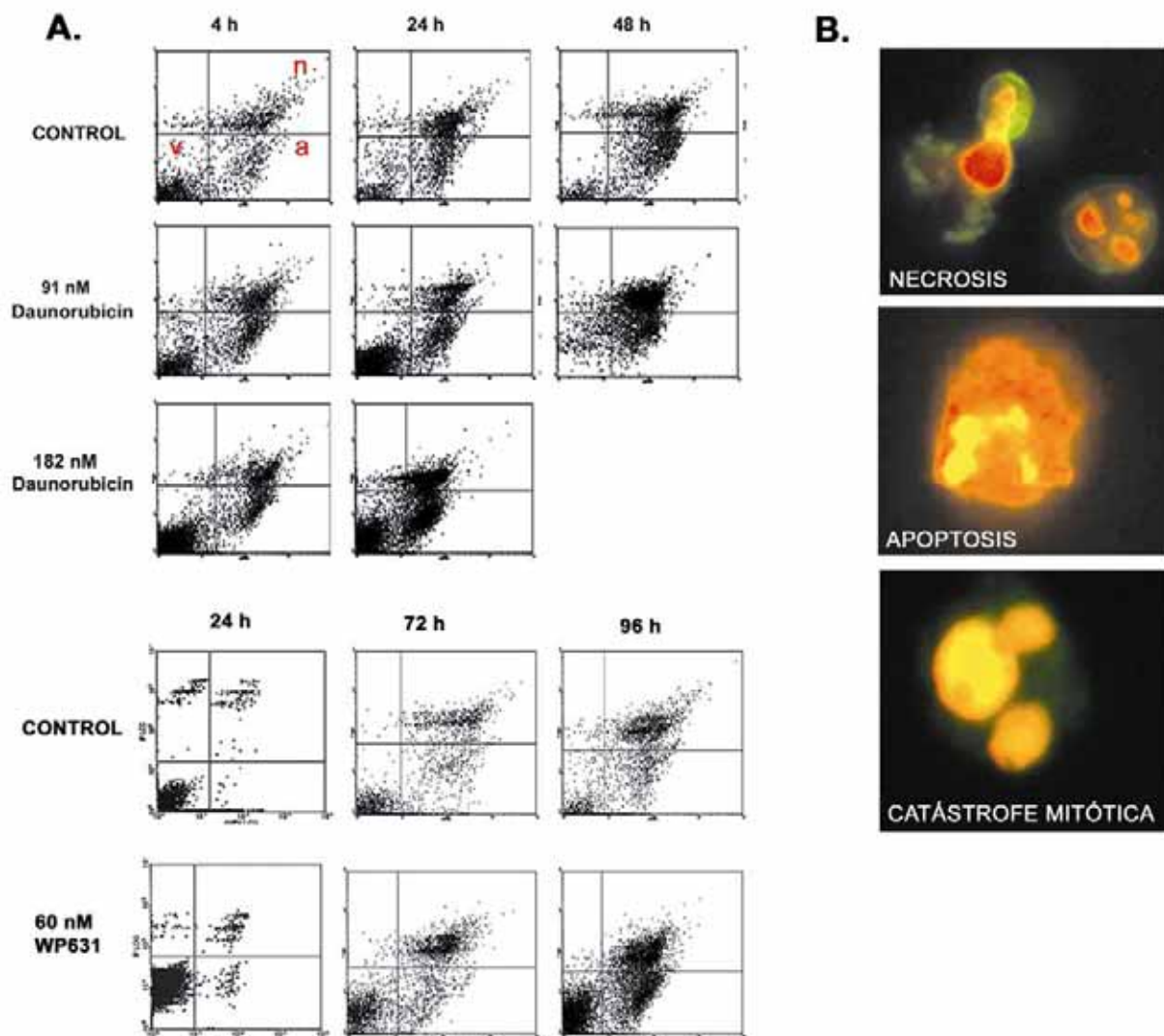


Figura R14. (A) Doble tinción con Anexina-V y yoduro de propidio de células Jurkat T tratadas con diferentes dosis de Daunorubicina o WP631. Las células, tratadas con Antraciclina durante diferentes tiempos se tiñeron y analizaron en un citómetro de flujo para determinar la proporción de células viables (v), apoptóticas (a), y necróticas y/o apoptóticas secundarias (n). (B) Triple tinción con Anexina-V, yoduro de propidio y naranja de acridina de células Jurkat T tratadas con diferentes dosis de Daunorubicina o WP631, en el momento del inicio de la muerte celular por necrosis (panel superior), apoptosis (panel central) o catástrofe mitótica (panel inferior). La morfología celular asociada a cada tipo de muerte se analizó por microscopía de fluorescencia. Se realizaron cuatro experimentos independientes, obteniéndose resultados similares.

El tratamiento con 60 nM WP631 no provocó la muerte de manera significativa de células Jurkat T hasta las 96 horas (1 día después tras el cambio de medio, después de 72 horas de tratamiento continuo) (Figura R14A), resultados que están de acuerdo con el análisis de la distribución de ciclo celular (Figura R3). Se puede observar que el tratamiento con WP631, asociado a la catástrofe mitótica (Figuras R9 y R13), provocó el aumento de células Anexina-V positivas y yoduro de propidio negativas (patrón de tinción de las células en fases iniciales de la apoptosis), a partir de las 72 horas. En otras palabras, el patrón de tinción con Anexina-V y yoduro de propidio de las células que sufrían catástrofe mitótica era el mismo que el de las células apoptóticas, pudiendo indicar que catástrofe mitótica y apoptosis comparten características morfológicas.

Para comparar la morfología de las células necróticas, apoptóticas y muertas por catástrofe mitótica, se añadió naranja de acridina a las células Jurkat T teñidas con Anexina y yoduro de propidio, y se analizaron por microscopía de fluorescencia. El naranja de acridina es un colorante que penetra en el interior de las células vivas y muertas (independiente del tipo de muerte celular), permitiendo la visualización del núcleo de todas las células. En la Figura R14B se muestra la morfología típica de células necróticas (correspondientes al tratamiento con 91 nM Daunorubicina), apoptóticas (182 nM Daunorubicina) y células que sufren catástrofe mitótica, tras el tratamiento con WP631. Aunque la morfología de las células que sufren catástrofe mitótica recuerda a las células apoptóticas, de los resultados obtenidos con el LSC (Figura R9), podemos deducir que lo que podría confundirse con cuerpos apoptóticos se trata, en realidad, de células multinucleadas.

Las Figuras R15 y R16 muestran los resultados de la doble tinción con Anexina y yoduro de propidio de las células MDA-MB-231 y MCF-7/VP. La tinción se realizó tanto sobre las células que crecían adheridas a los frascos como sobre las células que se encontraban en suspensión en los sobrenadantes. En todos los casos se observó que la mortalidad de las células adheridas aumentó con el tiempo. Sin embargo, como las células muertas pierden la capacidad de permanecer adheridas, el mayor incremento de muerte celular se observó en los sobrenadantes. Resultados previos presentados en este trabajo demuestran que los diferentes tratamientos realizados provocaron la muerte celular por catástrofe mitótica en estas líneas celulares (Figuras R3, R10 y R11). En las Figuras R15 y R16 se puede comprobar a simple vista que la mayoría de células muertas presentaron un patrón de tinción comparable al de las células apoptóticas. Este

resultado confirma que el patrón de tinción de células apoptóticas y células que mueren por catástrofe mitótica es idéntico, en consonancia con los resultados obtenidos con las células Jurkat T. Sabiendo que las células MDA-MB-2331 y MCF-7/VP tratadas con Antraciclinas mueren por catástrofe mitótica y no por apoptosis, hablaremos de catástrofe mitótica para referirnos a las células positivas para la Anexina y negativas para el yoduro de propidio.

La mayoría de las células MDA-MB-231 sin tratar (control), eran viables a lo largo de todos los tiempos analizados, tanto en las células adheridas, como en suspensión, aunque se detectó un cierto porcentaje de muerte celular entre las células que flotaban en los sobrenadantes de los cultivos control (Figura R15). La mortalidad en las células MDA-MB-231 tratadas con 2 μ M Doxorubicina ó 157 nM WP631 (sus IC_{75} respectivas), fue muy superior a las células control a partir de las 96 horas de tratamiento (Figura R15). El aumento de la mortalidad se observó sobretodo en las células en suspensión. La proporción de células que sufren catástrofe mitótica y necrosis en los sobrenadantes fue equivalente a las 96 horas. Esto podría deberse a que las células que iniciaron la catástrofe mitótica antes de las 96 horas acabaran reventando, en un fenómeno comparable a la apoptosis secundaria. Cuando se cambió el medio de cultivo tras 96 horas de tratamiento continuo, la proporción de células muertas por catástrofe mitótica fue siempre superior a la de células necróticas, especialmente en los sobrenadantes (Figura R15).

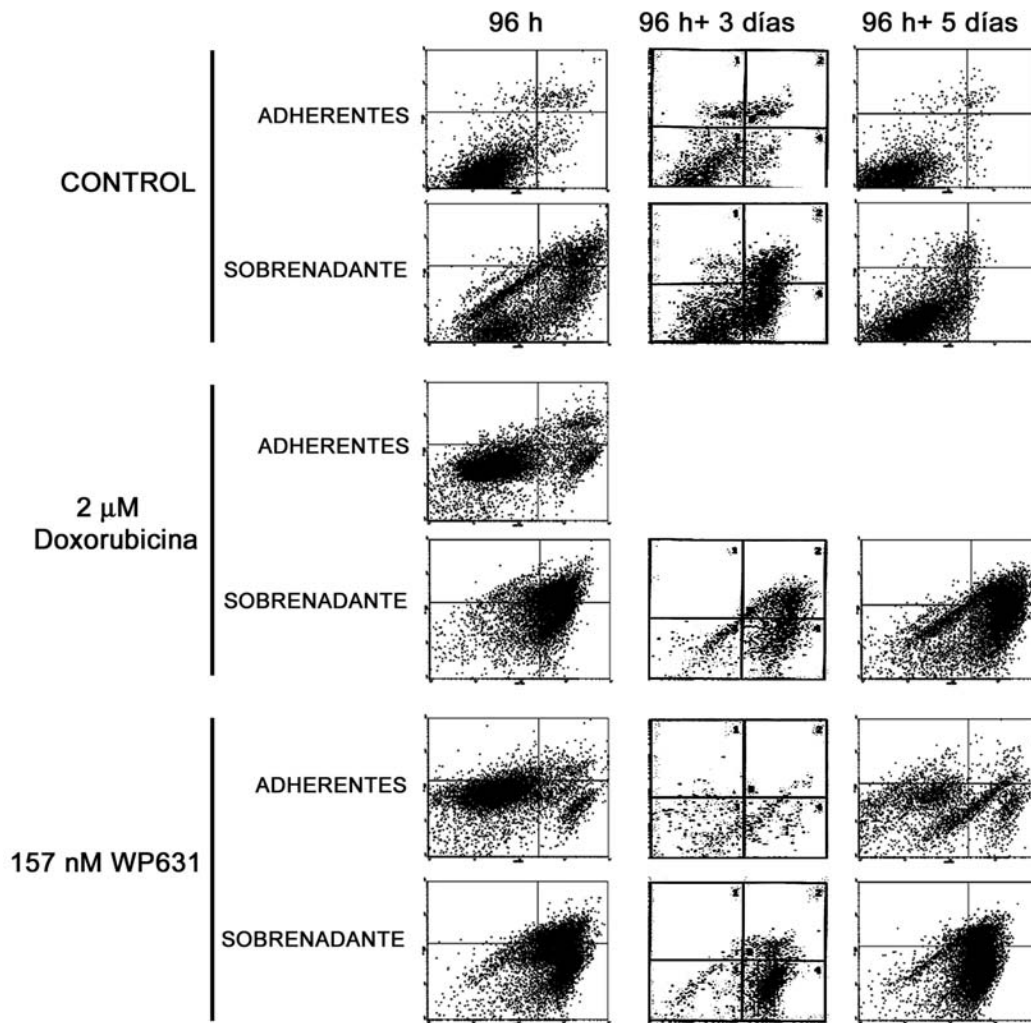


Figura R15. Doble tinción con Anexina-V y yoduro de propidio de células MDA-MB-231 tratadas con 2 μM Doxorubicina o 157 nM WP631. La tinción se realizó sobre las células adheridas a los frascos y sobre las células en suspensión. Se realizaron cuatro experimentos independientes, obteniéndose resultados similares.

La Figura R16 muestra los resultados del único tratamiento que produjo la muerte del 100% de las células MCF-7/VP. Se trata de la dosis IC_{75} para la WP631 (594 nM) WP631, determinada a las 96 horas. El análisis de las células tratadas con 594 nM WP631 reveló el aumento de la mortalidad con el tiempo, tanto en las células adheridas como, sobretodo, en las células en suspensión. Tal y como era de esperar, la mayoría de células murieron por catástrofe mitótica, encontrándose flotando en los sobrenadantes.

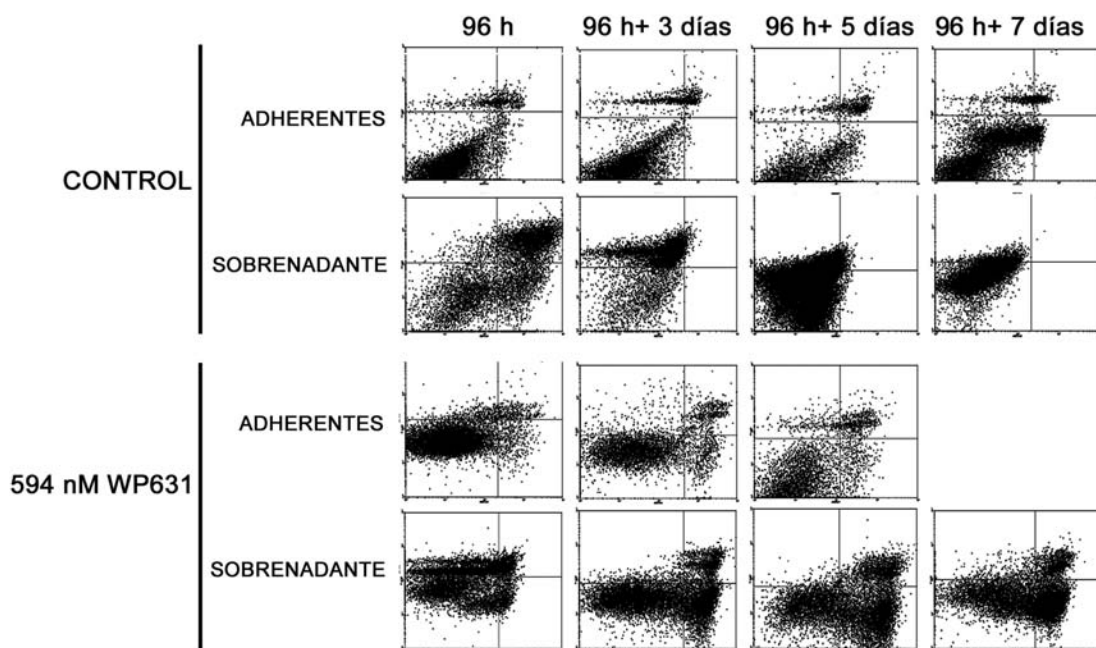


Figura R16. Doble tinción con Anexina-V y yoduro de propidio de células MCF-7/VP tratadas con 594 nM WP631. La tinción se realizó sobre las células adheridas a los frascos y sobre las células en suspensión. Se realizaron cuatro experimentos independientes, obteniéndose resultados similares.

4.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE $p53$, $c-myc$ Y $p21^{WAF1}$ EN LAS CÉLULAS JURKAT T, MDA-MB-231 Y MCF-7/VP, TRATADAS CON ANTRACICLINAS

Los genes $p53$, $c-myc$ y $p21^{WAF1}$ están involucrados en el control del ciclo celular (véase Introducción). Dado que se ha demostrado su implicación directa en procesos de apoptosis, senescencia celular y catástrofe mitótica (Roninson, 2002) se determinó si su expresión variaba en células Jurkat T, MDA-MB-231 y MCF-7/VP en presencia de Antraciclina.

4.9.1. Análisis de los niveles de transcripción mediante RT-PCR semicuantitativa

Se realizaron experimentos de RT-PCR semicuantitativa, utilizando cebadores específicos para los genes $p53$, $c-myc$, $p21^{WAF1}$ y $GAPDH$ (Materiales y Métodos). En cada reacción se coamplificaba el RNA correspondiente al gen de interés ($p53$, $c-myc$ y $p21^{WAF1}$) y el RNA correspondiente al gen constitutivo $GAPDH$ (control interno).

Las extracciones del RNA molde se realizaron en el momento en que los fármacos comenzaron a acumularse en el interior de las células: a las 4 horas en el caso de las células Jurkat T, y a las 24 horas en las células MDA-MB-231 y MCF-7/VP (Figura R6).

La Figura R17 muestra los cambios en la expresión de los genes *p53* y *c-myc* que se produjeron cuando se trataron las células Jurkat T con diferentes dosis de Daunorubicina o WP631. Se observa que las dos dosis de Daunorubicina (IC_{50} e IC_{75}) provocaron el aumento de los niveles de RNA correspondientes a *p53*, mientras que el tratamiento con WP631 (dosis IC_{75}) redujo de manera drástica la transcripción de los genes *p53* y *c-myc*. Mientras la dosis IC_{75} para la Daunorubicina redujo ligeramente los niveles de transcritos correspondientes a *c-myc*, la dosis IC_{50} se asoció al aumento de los mismos (Figura R17). Los niveles de mRNA correspondientes a *p21^{WAF1}* eran tan reducidos en la línea Jurkat T, que sólo se detectaban las bandas correspondientes al gen cuando se realizaban más de 35 ciclos de amplificación. Al realizar tantos ciclos, las señales que se obtenían para el control interno *GAPDH* estaban saturadas y había gran cantidad de bandas inespecíficas. Esto hacía imposible realizar una valoración fiable de los cambios en los niveles de transcripción de *p21^{WAF1}*, por lo que no se muestran los resultados obtenidos en este trabajo.

Comprobamos que la expresión del gen *p53* era reducida en las células Jurkat T, ya que necesitamos realizar 30 ciclos de amplificación para poder detectar bandas, mientras que 25 ciclos de amplificación fueron suficientes en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7/VP. Se ha descrito que los niveles de mRNA de *p53* son elevados en las células tumorales cuando el gen está mutado (te Poêle et al., 2002). Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos, ya que sabemos que nuestro clon de células Jurkat T contiene *p53* funcional, mientras que *p53* no es funcional en la línea MDA-MB-231 (D'Assoro et al., 2004). Por otro lado, aunque no realizamos un análisis mutacional de *p53* en la línea MCF-7/VP, en modelos similares de células MCF-7 resistentes a antitumorales se pierde la funcionalidad de *p53*, fenómeno íntimamente ligado a la sobreexpresión de las proteínas asociadas a resistencia MDR-1 y MRP-1 (Schneider et al., 1994). Dado que observamos que los niveles de mRNA de *p53* en las células MCF-7/VP eran elevados (comparables a la línea MDA-MB-231), inferimos que era muy probable que el gen *p53* tampoco fuera funcional en esta línea. Por este motivo, las reacciones de RT-PCR realizadas para detectar *p53* en las líneas MDA-MB-231 y

MCF-7/VP, se utilizaron únicamente como control y no se muestran en esta memoria; aunque detectáramos cambios a nivel transcripcional, éstos no tendrían ninguna relevancia al corresponder a mRNA de una proteína no funcional.

La Figura R17 muestra también los resultados obtenidos con las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7/VP. En las células MDA-MB-231, tanto la Doxorubicina como la WP631, redujeron los niveles de transcripción de los genes *c-myc* y *p21^{WAF1}*. Se puede comprobar que la reducción de la transcripción de estos genes fue mucho más acentuada con el tratamiento con 2 μ M Doxorubicina, ya que no detectamos ninguna banda después de 25 ciclos de amplificación. De la misma manera, el tratamiento de las células MCF-7/VP con 594 nM Doxorubicina, redujo la transcripción de *c-myc*, respecto a las células sin tratar, mientras que los niveles de mRNA correspondientes al gen *p21^{WAF1}* aumentaron muy significativamente tras 24 horas de tratamiento continuo.

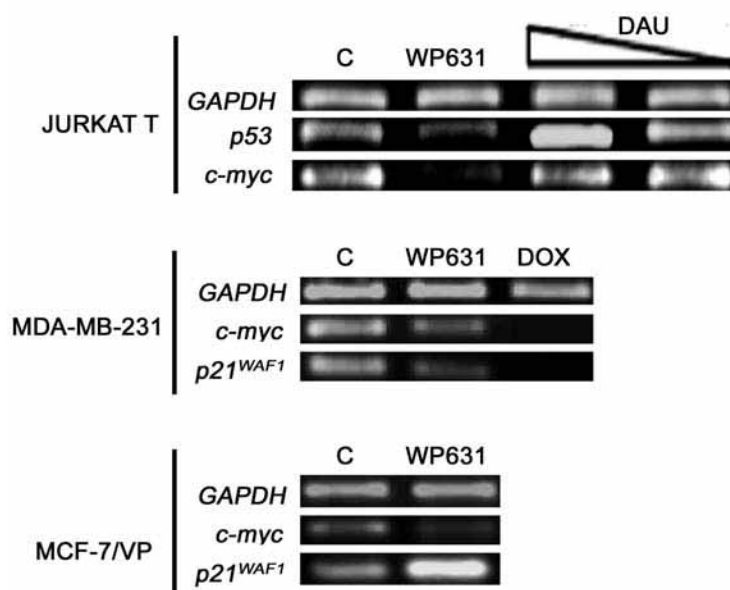


Figura R17. RT-PCR semicuantitativa para determinar los cambios en la expresión de los genes *p53*, *c-myc* y *p21^{WAF1}*, implicados en los procesos de apoptosis, senescencia celular y catástrofe mitótica. Se coamplificaron en un mismo tubo los fragmentos de cDNA correspondientes al gen constitutivo *GAPDH* (control interno) y al gen de interés. Se realizaron cuatro-cinco experimentos independientes, obteniéndose resultados similares.

4.9.2. Análisis de los niveles de proteínas mediante *Western blot*

Comprobamos si los cambios detectados en los niveles de transcripción tras periodos cortos de tratamiento (4 ó 24 horas) se traducían en cambios a nivel de proteína. Para

ello analizamos los niveles de las proteínas p53, c-Myc y p21^{WAF1} de células tratadas con diferentes dosis de Antraciclinas durante diferentes periodos de tiempo. Nos centramos en el análisis de los cambios en los niveles de estas proteínas en aquellos tratamientos asociados a senescencia y catástrofe mitótica. Se efectuaron extracciones de proteínas a diferentes tiempos: desde el momento inicial de los tratamientos (t=0), a diferentes intervalos, y hasta el momento inmediatamente anterior a la muerte de las células (véase Materiales y Métodos).

La Figura R18A muestra los resultados obtenidos con la línea celular Jurkat T. Para detectar las bandas correspondientes a las proteínas p53 y p21^{WAF1} fue necesario exponer las películas de autorradiografía durante más de 20 minutos. Esto confirma que, en condiciones normales, la expresión de los genes *p53* y *p21^{WAF1}* es reducida en células Jurkat T (al menos en el clon que hemos utilizado). El tratamiento de las células con 91 nM Daunorubicina indujo un aumento inicial (4 horas de tratamiento) de los niveles de las proteínas c-Myc y p53 (Figura R18A), de acuerdo con los cambios en los niveles de mRNA que habíamos observado (Figura R17). Sin embargo, los niveles de las dos proteínas se redujeron a partir de las 24 horas de tratamiento, coincidiendo con el aumento de la proteína p21^{WAF1} (Figura R18A).

El tratamiento de las células Jurkat T con 60 nM WP631 indujo la reducción de los niveles de las proteínas c-Myc y p53 de forma dependiente del tiempo (Figura R18A). La reducción de los niveles de ambas proteínas se produjo en paralelo, empezándose a detectar a partir de las 24 horas de tratamiento continuo. La Figura R18B muestra una cuantificación de los resultados obtenidos. La reducción de los niveles de la proteína c-Myc fue más acentuada que la reducción de los niveles de p53 entre las 24 y las 32 horas de tratamiento. Sin embargo, tras 72 horas de tratamiento continuo, momento a partir del cual se inicia la muerte de las células por catástrofe mitótica (Figura R9), el porcentaje de reducción de los niveles las dos proteínas fue equivalente (Figura R18B). Por otro lado, se pudo comprobar que los niveles de proteína p21^{WAF1} eran tan reducidos en las células tratadas con 60 nM WP631, que resultó imposible determinar cualquier cambio, ya que no observamos la banda correspondiente a la proteína. Se puede concluir que los cambios en los niveles de las proteínas analizadas concuerdan con los cambios en los niveles de transcripción que habíamos observado previamente (Figura R17), si bien con p21^{WAF1} los cambios en la proteína no pudieron determinarse. Estos resultados sugieren que la WP631 induce la

reducción de los niveles de p53 entre las 24 y las 72 horas de tratamiento, haciendo que las células Jurkat T se comporten como células sin p53 funcional. Este resultado nos provee de una explicación de porqué estas células respondieron al tratamiento activando muerte por catástrofe mitótica que, a diferencia de la apoptosis, puede producirse sin p53 (Roninson, 2002).

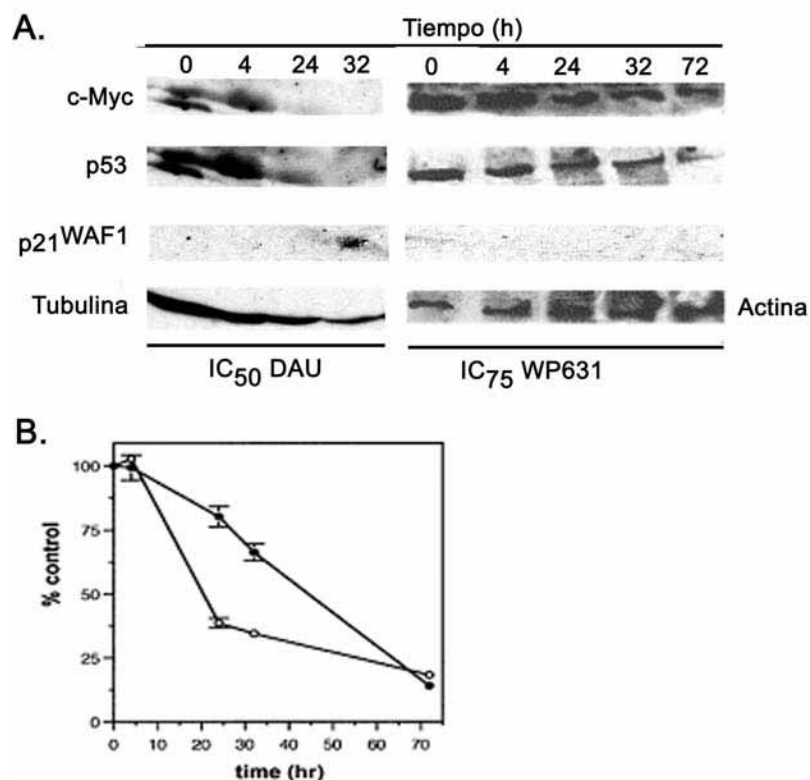


Figura R18. Análisis de los cambios en los niveles de las proteínas c-Myc, p53 y p21^{WAF1} en células Jurkat T tratadas con Daunorubicina o WP631. (A) *Western blot* que muestra las variaciones en los niveles de las proteínas c-Myc, p53 y p21^{WAF1}. Se utilizó la tubulina o la actina como control de carga. (B) Cuantificación de los cambios en los niveles de las proteínas c-Myc y p53 en células Jurkat T tratadas con 60 nM WP631. Los niveles de ambas proteínas se redujeron el paralelo, siendo más acentuada la reducción de los niveles de c-Myc. Se representan los valores promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

La Figura R19 muestra los cultivos de células MDA-MB-231 y MCF-7/VP tratados con Doxorubicina o WP631 durante diferentes tiempos, así como los resultados de *Western blot*. La densidad de los cultivos se redujo muy significativamente a partir las 24 horas de los tratamientos (Figura R19A). Por este motivo, para poder conseguir la cantidad de proteína total necesaria para realizar los diferentes experimentos de *Western blot*, fue necesario trabajar con varios frascos de cultivo y juntar las células

correspondientes a cada tratamiento. De esta manera, usando las células de un total de 10 frascos por condición, pudimos conseguir extractos proteicos correspondientes a células MDA-MB-231 y MCF-7/VP tratadas con Doxorubicina o WP631 durante 24 y 48 horas, pero no de cultivos correspondientes a tiempos de tratamiento superiores a las 48 horas, ya que el número de frascos requeridos era prohibitivo.

El tratamiento con Doxorubicina y WP631 provocó la reducción los niveles de la proteína p21^{WAF1} en la línea celular MDA-MB-231 (Figura R19B). Los niveles de p21^{WAF1} se redujeron drásticamente tras 24 horas de tratamiento continuo, tanto con Doxorubicina como con WP631. Sin embargo, el tratamiento de las células MCF-7/VP con WP631 aumentó significativamente los niveles de proteína p21^{WAF1} (Figura R19B). El incremento de la proteína se observó a las 24 horas de tratamiento, y éste se mantuvo hasta las 48 horas. Estos resultados se corresponden a los cambios observados a nivel de mRNA correspondientes al gen *p21^{WAF1}* (Figura R17).

Resultó especialmente complicado interpretar los resultados correspondientes a la proteína c-Myc (Figura R19B) y relacionarlos con los cambios observados a nivel transcripcional (Figura R17). Los niveles de la proteína c-Myc aumentaron en todos los casos, aunque en las células MDA-MB-231 tratadas con 157 nM WP631 (IC₇₅) los niveles de c-Myc volvieron a reducirse de las 48 horas de tratamiento (Figura R19B). El aumento de los niveles de la proteína c-Myc entre las 24 y las 24 horas de tratamiento representaría una respuesta inicial a los tratamientos, pudiendo darse el caso de que los niveles de c-Myc se redujeran con el tiempo (más allá de las 48 horas).

4.10. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS -2 Y -3

Se determinó si en el momento en que los diferentes tratamientos indujeron la muerte celular, las caspasas-2 y -3 eran activas (Tabla R4). Detectamos que el tratamiento de las células Jurkat T con 182 nM Daunorubicina (IC₇₅) estaba asociado a una fuerte activación de las caspasas-2 y -3, igual que el tratamiento con la mitad de la dosis, 91 nM, aunque ésta resultó menor. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que ambos tratamientos estuvieran asociados a la inducción de apoptosis (Figura R14).

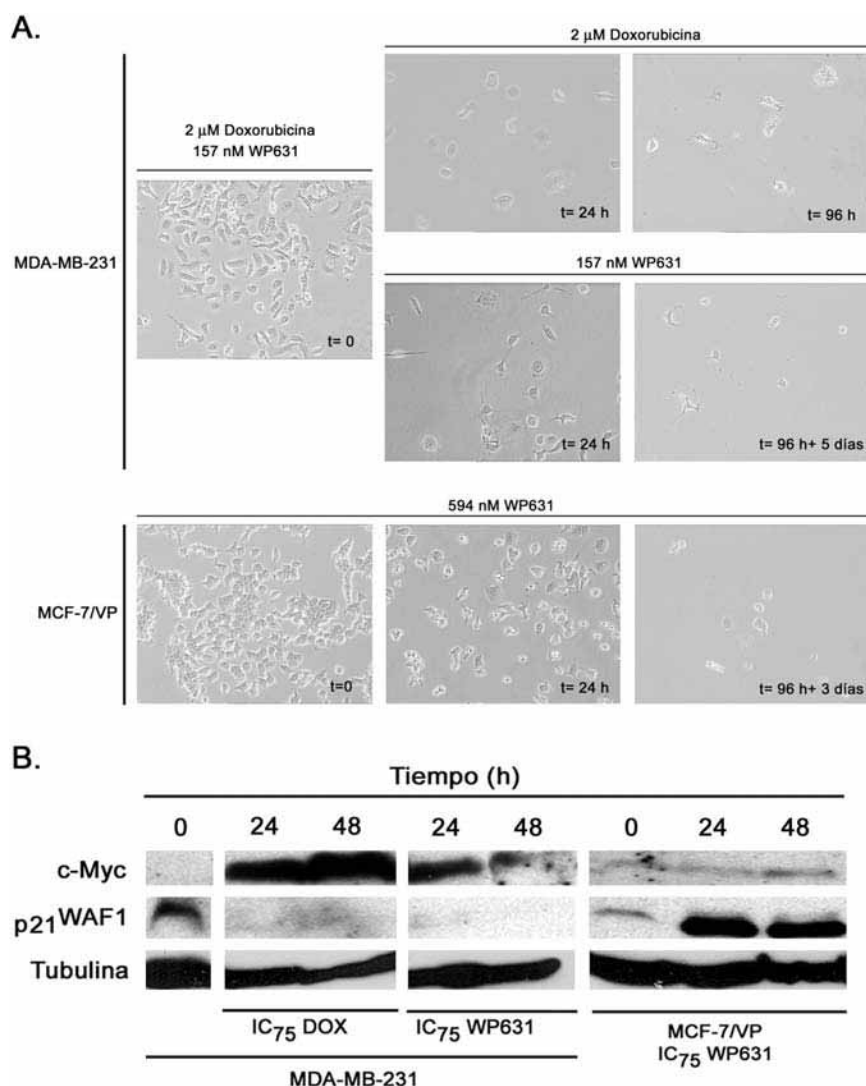


Figura R19. Imágenes de las células MDA-MB-231 y MCF-7/VP tratadas durante diferentes tiempos con Doxorubicina o WP631, y análisis de los cambios en los niveles de las proteínas c-Myc y p21^{WAF1}. (A) Imágenes obtenidas con un microscopio óptico que muestran la reducción de la concentración del número de células, que se produce con el tiempo en los cultivos tratados con Doxorubicina o WP631. Fue necesario juntar las células correspondientes a varios frascos para poder realizar los extractos, no pudiéndose trabajar con cultivos tratados con Antraciclina durante más de 48 horas. (B) *Western blot* que muestra las variaciones en los niveles de las proteínas c-Myc y p21^{WAF1}. Se utilizó la tubulina o la actina como control de carga.

Se observó que la muerte por catástrofe mitótica podía ser un fenómeno tanto dependiente como independiente de la activación de estas caspasas (Tabla R4). Por ejemplo, se detectó activación en las células MDA-MB-231 tratadas con 2 μ M Doxorubicina (IC₇₅), pero no en las células MDA-MB-231 tratadas con 157 nM (IC₇₅) WP631 (Tabla R4). Por otro lado, en las células Jurkat T tratadas con 60 nM WP631 (IC₇₅), y en las células MCF-7/VP tratadas con 594 nM WP631 (IC₇₅), ni la caspasa-3, ni la caspasa -2 estaban activadas (Tabla R4). El resultado obtenido con las

células MCF-7/VP está de acuerdo con el hecho de que esta línea celular carece de caspasa-3 funcional (Essmann et al., 2004).

Tabla R4. Determinación de la activación de las caspasas-2 y -3 durante los procesos de muerte celular por apoptosis, senescencia o catástrofe mitótica, inducidos por Antraciclinas. La activación de las caspasas se determinó mediante un ensayo colorimétrico, basado en la proteólisis de los sustratos de las caspasas-2 y -3 activas (Materiales y Métodos). (+<+++<+++; activación; - no activación).

LÍNEA	JURKAT T			MDA-MB-231		MCF-7/VP
	IC ₇₅ DAU	IC ₅₀ DAU	IC ₇₅ WP631	IC ₇₅ DOX	IC ₇₅ WP631	IC ₇₅ WP631
Muerte celular ^(a)	24 h	48 h	72 h	96 h	96 h + 5 días	96 h + 3 días
caspasa-2	++++	++	-	+++	-	-
caspasa-3	++++	++	-	+++	-	-

^(a) Tiempo en que se inicia la muerte celular de manera masiva.

Partiendo del hecho de que la activación máxima de las caspasas-2 y -3 tuvo lugar con el tratamiento de las células Jurkat T con 182 nM Daunorubicina (tratamiento que provocó el mayor porcentaje de apoptosis), se determinó el porcentaje de activación de las caspasas -2 y -3 en el resto de tratamientos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla R5. La activación de las caspasas -2 y -3 en las células Jurkat T tratadas con 91 nM Daunorubicina durante 24 horas fue de un 30% y cerca de un 60%, respectivamente. Este resultado coincide con el hecho que el tratamiento con 91 nM Daunorubicina indujera la muerte de una parte de las células por apoptosis (Figura R14).

La Tabla R5 muestra también los resultados obtenidos para la línea celular MDA-MB-231 tratada con 2 µM Doxorubicina durante 96 horas. Se determinó la activación de las caspasas -2 y -3, tanto en las células adheridas a los frascos como en las células que se encontraban en suspensión en el sobrenadante. La activación de las caspasas -2 y -3, tanto de las células adheridas como de las células en suspensión, fue claramente muy superior a la activación observada en las células Jurkat T tratadas con 60 nM WP631. El porcentaje máximo de activación se obtuvo en las células del sobrenadante (más del 70% de activación), probablemente porque la mayoría de células que habían muerto por catástrofe mitótica se encontraban en suspensión, de acuerdo con los resultados presentados en la Figura R15.

Tabla R5. Porcentaje de activación de las caspasas-2 y -3 en células Jurkat T tratadas con la dosis IC₅₀ para la Daunorubicina, o en células MDA-MB-231 tratadas con la dosis IC₇₅ para la Doxorubicina. Se determinó la activación de las caspasas en el momento en que se iniciaba la muerte de las células, asumiendo que la activación máxima de las caspasas-2 y -3 tenía lugar con el tratamiento de las células Jurkat T con 182 nM Daunorubicina. Se indica el valor promedio de cuatro experimentos independientes y las desviaciones estándar.

	JURKAT T	MDA-MB-231	
	IC ₅₀ Daunorubicina, 48 h	IC ₇₅ Doxorubicina, 96 h	
		Adherentes	Suspensión
caspasa-2	30,3 ± 6,1	38,6 ± 10,1	71,8 ± 18,7
caspasa-3	58,9 ± 3,1	53,5 ± 8,5	103,3 ± 11,3

RIII. EL EFECTO CITOTÓXICO DE LA WP631 ESTÁ RELACIONADO CON SU CAPACIDAD DE DESPLAZAR AL FACTOR Sp1 DE SU LUGAR DE UNIÓN EN EL DNA

Experimentos *in vitro*, realizados previamente en nuestro laboratorio, demostraron que la WP631 es mucho más eficaz que la Daunorubicina inhibiendo la transcripción dependiente de Sp1 (Martín et al., 1999). Hemos analizado si la WP631 es también capaz de interferir con la unión del factor Sp1 al DNA *in vivo* (células en cultivo) y si esto puede relacionarse con el hecho de que la Bisantraciclina WP631 fuera un agente antiproliferativo más eficaz que las Antraciclina monoméricas, incluso en la línea MCF-7/VP, con fenotipo MDR.

En este contexto, hemos analizado si la WP631 es capaz de modular la transcripción del gen asociado a la resistencia múltiple *mrp-1*, que se encuentra sobreexpresado en las células MCF-7/VP y que está regulado por Sp1 (véase Introducción). Por otro lado, hemos analizado el efecto que tiene la WP631 sobre la transcripción de genes involucrados en el control del ciclo celular, muchos de ellos regulados por Sp1, que podrían explicar las respuestas celulares observadas tras los tratamientos. Para ello, escogimos como modelo de estudio la línea celular Jurkat T.

4.11. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA WP631 DE MODULAR LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA MRP-1 EN LAS CÉLULAS MCF-7/VP

Se realizó una RT-PCR a partir de RNA de células MCF-7/VP para determinar la expresión de las proteínas asociadas a resistencia, MDR-1 y MRP-1. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R20A, y confirman que, en esta línea celular, se expresa el gen *mrp-1* pero no el gen *mdr-1*. El factor de transcripción Sp1 regula positivamente la transcripción del gen *mrp-1* (Introducción). El lugar de unión de Sp1 en el promotor de *mrp-1* contiene pasos CpG donde la WP631 podría intercalarse, compitiendo y desplazando al factor de transcripción Sp1, con mayor efectividad que la Doxorubicina (Figura R20B).

En este contexto, nos planteamos la hipótesis de que el tratamiento con la dosis IC_{75} para la WP631 podría inhibir la transcripción del gen *mrp-1* en la línea celular MCF-7/VP y que, por ese motivo, las células eran sensibles a este tratamiento. Se extrajo RNA de células MCF-7/VP tratadas durante 24 horas con 307 nM Doxorubicina (IC_{50}), 122 nM WP631 (IC_{50}) ó 594 nM WP631 (IC_{75}) y de células sin tratar (control). Se realizó una RT-PCR semicuantitativa en la que, en un mismo tubo, se amplificaban los genes *GAPDH* (control interno) y *mrp-1* (Figura R21). Se observa que el tratamiento durante 24 horas de las células MCF-7/VP con 307 nM Doxorubicina, aumentó de los niveles de RNA correspondientes a *mrp-1*. La cuantificación de las bandas mostró que este aumento era de un 7% en los diferentes experimentos realizados. De la misma manera, observamos que el tratamiento durante 24 horas con 122 nM WP631 provocó una ligera reducción (del 3-4%) en los niveles de RNA del gen *mrp-1*, con respecto al control. El tratamiento de las células MCF-7/VP con la dosis IC_{75} para la WP631 (594 nM) provocó una reducción de los niveles de RNA del gen *mrp-1* a las 24 horas de tratamiento, que oscilaba entre el 18 y el 21% en los diferentes experimentos independientes realizados. En la Figura R21 se observa que, tras 96 horas de tratamiento continuo con 594 nM WP631, los niveles de RNA correspondientes a *mrp-1*, se redujeron todavía más (~40-49%).

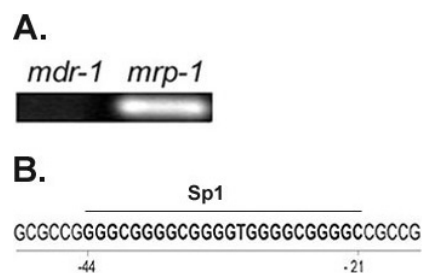


Figura R20. (A) RT-PCR que demuestra que el gen *mrp-1* pero no el gen *mdr-1* se expresa en las células MCF-7/VP. El experimento se repitió cinco veces, no detectándose expresión de *mdr-1* en ningún caso. (B) Región promotora proximal del gen MRP-1 humano (ENSG00000103222). Se indica el lugar de unión del factor Sp1 (en negrita y subrayado), que contiene pasos CpG, donde la WP631 podría bisintercalarse e interferir con la unión del factor de transcripción en el DNA.

Estos resultados indican que únicamente la IC₇₅ para la WP631, pero no las dosis IC₅₀ para la WP631 o la Doxorubicina, provoca una reducción significativa de la expresión del gen *mrp-1*. Esto podría deberse a que esta dosis de WP631 es capaz de desplazar al factor de transcripción Sp1 de su lugar de unión en el promotor del gen (Figura R20B), mientras que una dosis inferior de WP631 (122 nM) no es suficiente para ejercer el mismo efecto.

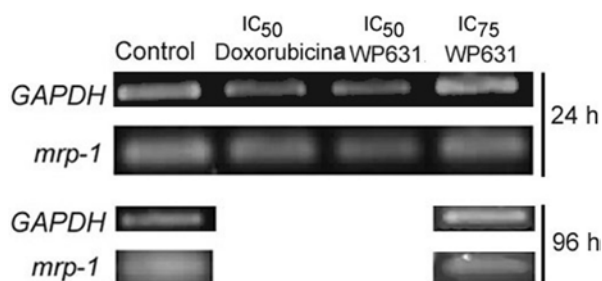


Figura R21. RT-PCR semicuantitativa usada para determinar cambios en los niveles de transcripción del gen *mrp-1* en células MCF-7/VP tratadas con Doxorubicina (IC₅₀) o diferentes dosis de WP631 (IC₅₀ e IC₇₅) durante 24 ó 96 horas. Junto con el gen *mrp-1* se coamplificó el gen constitutivo *GAPDH* (control interno).

Se analizó la actividad de la proteína asociada a resistencia MRP-1 para poder relacionar los cambios en la expresión del gen con la respuesta de las células MCF-7/VP a cada uno de los tratamientos. Nuestra hipótesis de trabajo fue que, si la reducción de los niveles de RNA del gen *mrp-1* observados implicaba también una reducción de los niveles de proteína, el tratamiento con 594 nM WP631 sería capaz de revertir el fenotipo MDR de las células MCF-7/VP, que sobreexpresan esta proteína. La

Figura R22 muestra los resultados obtenidos para la determinación de la actividad de las proteínas MDR-1 y MRP-1 en células MCF-7/VP tratadas con 594 nM WP631, con 122 nM WP631 ó 307 nM Doxorubicina, o sin tratar. La actividad de las proteínas asociadas a resistencia múltiple se determinó tras 24 y 96 horas con los diferentes tratamientos (Figuras R22A y R22B). Las muestras tomadas en cada una de las condiciones se subdividieron en tres frascos con el fin de determinar, en paralelo, la intensidad de la fluorescencia en presencia de un inhibidor de las proteínas MDR-1 y MRP-1, *Inhibidor 1* (en rojo en la Figura R22), de un inhibidor exclusivo de la proteína MRP-1, *Inhibidor 2* (en lila en la Figura R22), o sin ningún inhibidor (en verde en la Figura R22). Para facilitar la interpretación de los resultados, la Figura R22 muestra la superposición de las tres mediciones realizadas para cada condición (*merge*). Como se puede observar, los *Inhibidores 1 y 2* se asociaron, como era de esperar, a picos de fluorescencia alta en todos los casos analizados. Esto es debido a que, al haberse inhibido las proteínas asociadas a resistencia, la calceína quedó retenida en el interior de las células. Se observa que, si se superponen los picos de fluorescencia obtenidos para las células control, los picos en presencia de los *Inhibidores 1 y 2* coinciden mientras que, el pico obtenido sin inhibidores, está desplazado a la izquierda (Figura R22). Las células control en ausencia de inhibidores dieron lugar a picos de baja fluorescencia, tanto a las 24 como a las 96 horas (Figuras R22A y R22B). Este resultado está de acuerdo con los resultados de RT-PCR obtenidos, que demostraron que las células MCF-7/VP sin tratar expresan la proteína MRP-1. Por lo tanto, en las células sin tratar, la calceína fue expulsada del citoplasma por acción de la proteína MRP-1.

Cuando se trataron las células con 307 nM Doxorubicina o con WP631 (122nM ó 594 nM) durante 24 horas, y en ausencia de inhibidores, se obtuvieron resultados similares (Figura R22A). Sin embargo, como se muestra en la Figura R22A, el pico obtenido tras el tratamiento durante 24 horas con 594 nM WP631 estaba más desplazado hacia la derecha que el resto de tratamientos y las células control. Estos resultados indican que los tratamientos con 307 nM Doxorubicina y 122 nM WP631 durante 24 horas no alteraron significativamente la actividad de las proteínas asociadas al fenotipo MDR, con respecto a las células sin tratar. Por otro lado, el tratamiento con 594 nM WP631, el único tratamiento asociado a una respuesta citotóxica según los resultados presentados anteriormente, indujo una reducción moderada de la actividad MDR a las 24 horas de tratamiento (Figura R22A).

La Figura R22B muestra los resultados que se obtuvieron tras 96 horas de tratamiento continuo con los diferentes fármacos y dosis. Se observa como el pico correspondiente al tratamiento con Doxorubicina y, sin inhibidores, continuaba desplazado a la izquierda, igual que a las 24 horas. Este resultado indica que el tratamiento con Doxorubicina no altera la actividad de las proteínas asociadas al fenotipo MDR y por este motivo, o al menos en parte, las células MCF-7/VP fueron resistentes a este fármaco. Por otro lado, el tratamiento con 122 nM WP631 durante 96 horas puso de manifiesto la presencia de dos subpoblaciones celulares: una subpoblación resistente (pico de fluorescencia baja, desplazado a la izquierda respecto al tratamiento equivalente en presencia de inhibidores, mostrado en la Figura R22B) y una población sensible al tratamiento (pico de fluorescencia alta que coincide con los picos obtenidos en presencia de inhibidores). Cuando se utilizó una dosis mayor, 594 nM WP631 durante 94 horas, se obtuvo un único pico de fluorescencia alta, que coincidía con los picos obtenidos en presencia de inhibidores (*merge*). Estos resultados se pueden interpretar como que 594 nM WP631 (IC_{75}) inhibe la actividad de las proteínas asociadas a resistencia, permitiendo que el fármaco pueda entrar al interior de las células y ejercer su actividad antiproliferativa.

Seguidamente se calculó la actividad de las proteínas MDR-1 y MRP-1 en las células MCF-7/VP, tratadas con Doxorubicina o WP631, o sin tratar durante 24 ó 96 horas. Las actividades se calcularon a partir de los valores de la fluorescencia media en los picos obtenidos en presencia del *Inhibidor 1*, del *Inhibidor 2* o en ausencia de inhibidores para cada tiempo y tratamiento (Materiales y Métodos). En ninguno de los casos se detectó actividad MDR-1. Este resultado es acorde con los resultados de RT-PCR presentados en el apartado anterior, donde se detectó la presencia de transcritos correspondientes al gen *mrp-1* pero no de *mdr-1* y con los resultados de otros grupos que han demostrado que en esta línea celular sólo se expresa la proteína MRP-1 (Schneider et al., 1994). Los valores de la actividad de MRP-1 obtenidos en cada caso se representan en la Figura R22C como el porcentaje de activación respecto a las células sin tratar. Se puede ver que la actividad de la proteína MRP-1 en las células tratadas con 307 nM Doxorubicina no varió significativamente respecto a las células control a lo largo del tiempo. Por otro lado, mientras que la actividad MRP-1 de las células tratadas con 122 nM WP631 durante 24 horas fue alta, tras 96 horas de tratamiento se podían distinguir dos subpoblaciones celulares, atendiendo a la actividad MRP-1. En la Figura

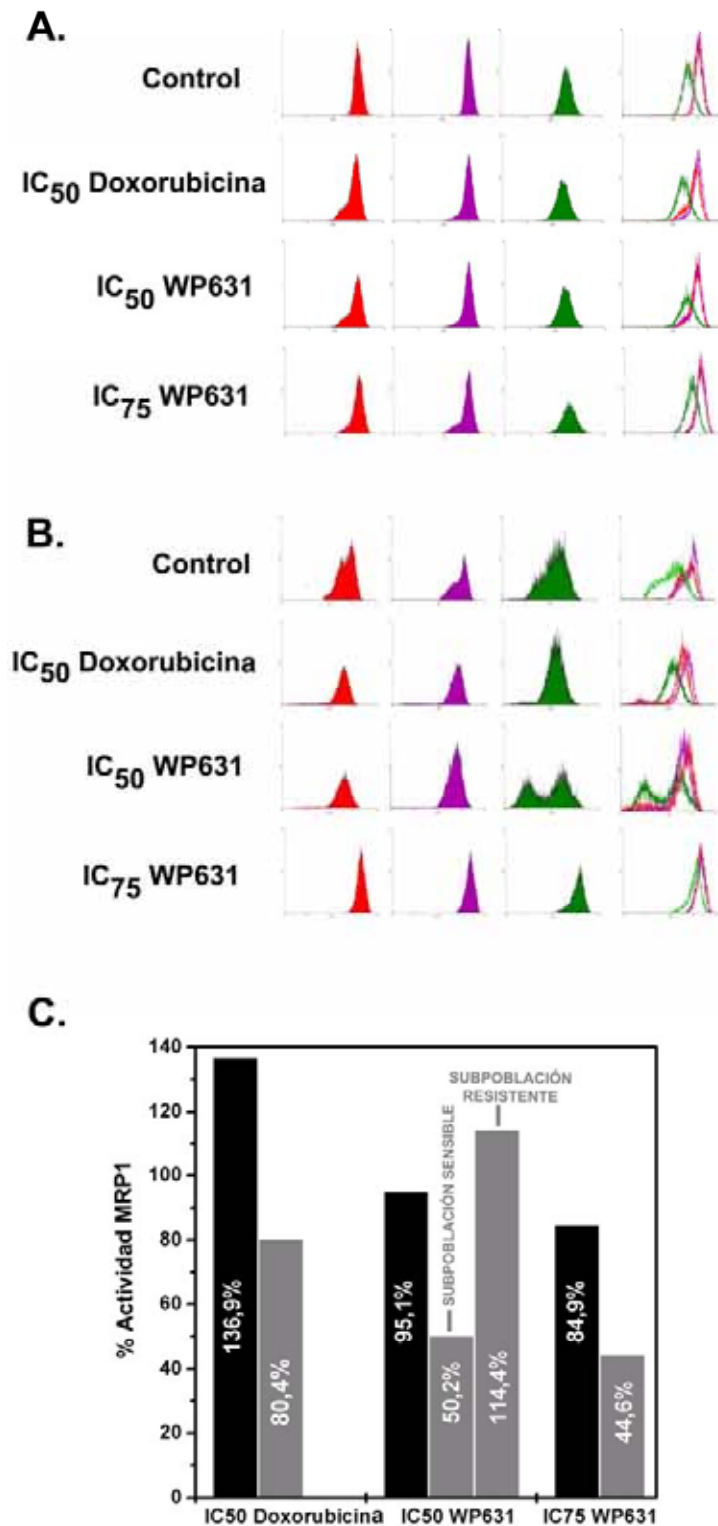


Figura R22. Determinación de la actividad de las proteínas MDR-1 y MRP-1 en células MCF-7/VP tratadas con 307 nM Doxorubicina, 122 nM WP631 ó 594 nM WP631, o sin tratar durante 24 (A) ó 96 horas (B). Tras los tratamientos se incubaron las células con un inhibidor de las proteínas MDR-1 y MRP-1 (*Inhibidor 1*), con un inhibidor exclusivo de MRP-1 (*Inhibidor 2*) o sin inhibidores y se determinó la fluorescencia intracelular de la calceína en un citómetro de flujo. Los valores de fluorescencia media obtenidos en cada caso se utilizaron para calcular el porcentaje de actividad de las proteínas MDR-1 y MRP-1, con respecto a las células sin tratar (C). Los valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes, con resultados similares.

R22C se puede observar una subpoblación celular resistente al tratamiento con 122 nM WP631 durante 96 horas, donde la actividad de la proteína fue, aproximadamente, del 114% respecto a las células sin tratar. También se observa una segunda subpoblación de células sensibles al tratamiento con una actividad MRP-1 reducida (aproximadamente del 50% respecto al control). El tratamiento de las células durante 96 horas con la dosis mayor de WP631 (su IC₇₅), indujo una reducción de la actividad de MRP-1 superior al 55% respecto a las células sin tratar.

4.12. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS POR ANTRACICLINAS EN LA LÍNEA JURKAT T

Se analizaron los perfiles de expresión génica diferencial de células Jurkat T tratadas durante 4 horas con las dosis IC₇₅ o IC₅₀ para la Daunorubicina (182 y 91 nM, respectivamente), la dosis IC₇₅ calculada para la WP631 (60 nM), o sin tratar (control). Utilizamos las membranas de *nylon* Oncogene & Tumor Suppressor Atlas Arrays (BD Clontech) para monitorizar los cambios en los niveles de transcripción de 199 genes (190 oncogenes o genes supresores de tumores, y 9 genes constitutivos).

La Figura R23A muestra los resultados obtenidos en cada caso. Las señales obtenidas se corrigieron por el *background* promedio de cada membrana y se normalizaron por la señal del gen constitutivo *GAPDH*. Para cada cDNA se calculó la relación de intensidades entre los distintos tratamientos respecto al control. Consideramos que había cambios significativos en la expresión cuando ésta era superior a 2.5 (≤ 0.4 ó ≥ 2.5). Para trabajar los datos con mayor facilidad se calcularon los logaritmos en base 2 de estas relaciones ya que, de esta manera, los valores de corte eran simétricos (≤ -1.32 ó ≥ 1.32) (véase Materiales y Métodos). En el Anexo I se presentan los valores promedio obtenidos en cada caso (experimentos realizados por triplicado) correspondientes a la cuantificación de la intensidad de las señales y el *background*, y a los valores corregidos y normalizados, así como el cálculo de relaciones. A partir de los datos corregidos se determinó la dispersión de los cambios en la expresión de los genes asociados a cada tratamiento respecto al control (Figura R23B y Anexo I). Se observó como cada tratamiento activó o inhibió la transcripción de distintos grupos de genes.

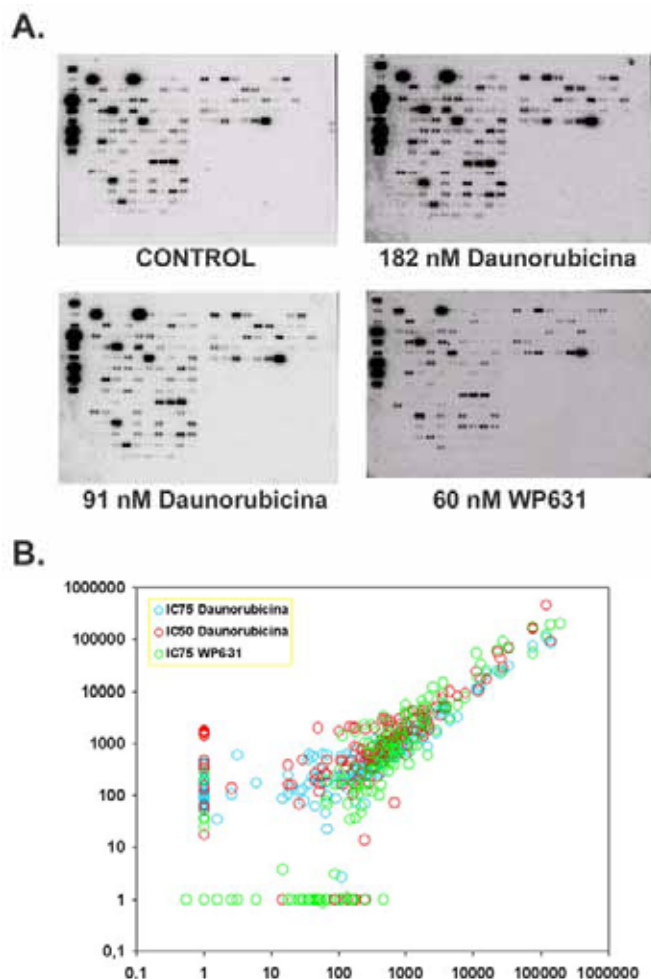


Figura R23. (A) Imágenes de las membranas de *nylon* Human Oncogene and Tumor Suppressor Atlas Arrays (BD Clontech) obtenidas en células Jurkat T. Las sondas de cDNA se obtuvieron a partir del RNA extraído de células tratadas con 182 nM ó 91 nM Daunorubicina (IC_{75} e IC_{50}), ó 60 nM WP631 (IC_{75}) durante 4 horas (Materiales y Métodos). (B) Dispersión de los cambios en la expresión de los genes asociados a cada tratamiento respecto al control, determinada a partir de los datos corregidos y normalizados (Materiales y Métodos). Cada tratamiento activó o inhibió la transcripción de distintos grupos de genes.

Para analizar más detalladamente los perfiles de expresión génica diferencial, los cambios en la transcripción observados respecto a las células sin tratar (activación o inhibición) se representan gráficamente en la Figura R24A. De los 199 genes analizados, cambió la expresión de 58 de ellos en presencia de 182 nM Daunorubicina, de 81 en presencia de 91 nM Daunorubicina, y de 77 cuando se trataron las células con 60 nM WP631. Se puede observar como los tratamientos con Daunorubicina indujeron mayoritariamente la activación transcripcional, especialmente la dosis IC_{75} (182 nM). De los 58 genes, cuya expresión cambió en presencia de 182 nM Daunorubicina, tan sólo 3 presentaban transcripción reducida. El tratamiento con 91 nM Daunorubicina inhibió la transcripción de 20 genes y activó 61. Por otro lado, el tratamiento con

WP631 produjo la inhibición de 43 genes y la activación de 34. A partir de estos resultados se puede concluir que el tratamiento con WP631, al menos en la línea celular Jurkat T, reduce la transcripción de un número elevado de genes, mientras que los tratamientos con Daunorubicina provocan, básicamente la activación de ciertos genes. Como hipótesis de partida, esto puede deberse a que la WP631 es un inhibidor de la transcripción dependiente de Sp1 más potente que la Daunorubicina (Martín et al., 1999; Portugal et al., 2001)

La expresión de algunos genes cambió en algunas ocasiones sólo con uno de los tratamientos, mientras que otros genes cambiaron con dos de ellos o con los tres. Al mismo tiempo, cuando la expresión de un gen cambiaba con los tres tratamientos o con dos, los cambios podían ser en el mismo sentido (por ejemplo, el gen estaba activado con los tres tratamientos) o en el sentido opuesto (por ejemplo, uno de los tratamientos activó la expresión de un gen, y los otros dos tratamientos la inhibieron). Para facilitar la interpretación de los resultados, se construyó un diagrama de Venn (Figura R24B). Se representa esquemáticamente el número de genes, cuya expresión cambió sólo con uno de los tratamientos, con dos o con los tres. La expresión de 29 genes cambió con los tres tratamientos. Cabe remarcar que, de estos 29 genes, 2 se activaron con los tres tratamientos, mientras que no se detectó ningún ejemplo en que la expresión de un gen se inhibiera con los tres tratamientos. Por otro lado, los dos tratamientos con Daunorubicina (182 y 91 nM) alteraron la expresión de 19 genes. Los tratamientos con 91 nM Daunorubicina ó 60 nM WP631 indujeron cambios en los niveles de transcripción de 15 genes, mientras que los tratamientos con 182 nM Daunorubicina ó 60 nM WP631 cambiaron la expresión de 3 de ellos, con respecto al control. Por último, se puede observar que la expresión de ciertos genes sólo cambió con uno de los tratamientos: 7 con 182 nM Daunorubicina, 18 con 91 nM Daunorubicina, y 30 con 60 nM WP631.

Una de las primeras conclusiones que se puede extraer a partir de estos resultados, es que el tratamiento con 91 nM Daunorubicina induce cambios en la expresión de un conjunto de genes que son comunes al tratamiento con 182 nM Daunorubicina (19 genes), y a otro grupo de genes, común al tratamiento con 60 nM WP631 (15 genes), mientras que los tratamientos con 182 nM Daunorubicina y 60 nM WP631 sólo comparten el cambio en la expresión de 3 genes. Los resultados de la Figura R24

indican que cada tratamiento indujo la activación/represión de una combinación concreta de genes.

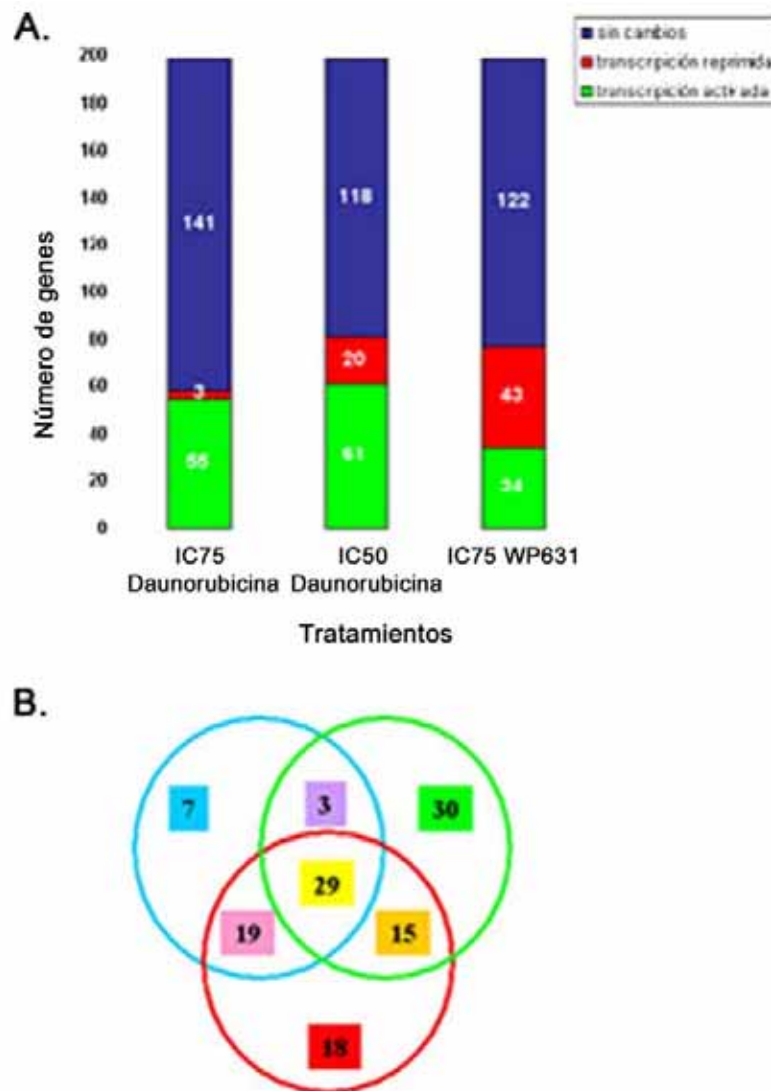


Figura R24. (A) Cambios en los perfiles de expresión génica en células Jurkat T tratadas durante 4 horas con 182 ó 91 nM Daunorubicina, ó 60 nM WP631. Se representa el número de genes cuya expresión no se alteró respecto al control (azul), y el número de genes que se activaron (verde) o reprimieron (rojo) en cada caso. (B) Diagrama de Venn. Se esquematiza el número de genes, cuya expresión se alteró con los tres tratamientos (amarillo), con los tratamientos con 182 y 91 nM Daunorubicina (rosa), con los tratamientos con 91 nM Daunorubicina y 60 nM WP631 (naranja), con los tratamientos con 182 nM Daunorubicina y 60 nM WP631 (lila), o sólo con uno de los tratamientos: 182 nM Daunorubicina (azul), 91 nM Daunorubicina (rojo) o 60 nM WP631 (verde).

La Tabla R6 muestra una selección de alguno de estos genes, involucrados en el control de la progresión del ciclo celular durante las fases G_1 y G_2 , la respuesta a daños en el DNA y la apoptosis. La activación de diferentes vías génicas puede estar en el origen del porqué la dosis IC_{75} para la Daunorubicina indujo la muerte por apoptosis en las células Jurkat T, mientras que la dosis IC_{50} indujo la senescencia celular y la WP631

provocó la muerte de las células por catástrofe mitótica (Figuras R3, R7, R8, R9, R13 y R14). En la Discusión se describirá más detalladamente la relación entre los cambios de expresión de alguno de estos genes con los mecanismos de muerte celular observados en cada caso.

Tabla R6. Selección de genes involucrados en los puntos de control celular G₁ y G₂, en la respuesta a lesiones en el DNA, y en el control de la apoptosis, cuya expresión cambia de manera diferencial en células Jurkat T tratadas con diferentes dosis de Daunorubicina o WP631 (los genes que se activan se indican con +, los que se inhiben con -, y los que quedan fuera del criterio de exclusión con =).

GENES	TRATAMIENTOS		
	182 nM Daunorubicina	91 nM Daunorubicina	60 nM WP631
<i>c-myc</i>	=	=	=
<i>ATM</i>	+	+	=
<i>p53</i>	+	+	-
<i>MDMX</i>	=	-	+
<i>BRC1-associated ring domain 1</i>	+	-	-
<i>p21^{WAF1}</i>	=	+	=
<i>N-Ras</i>	=	+	+
<i>p16^{INK4}</i>	+	-	-
<i>p14^{INK4B}</i>	+	+	-
<i>Ciclina D3</i>	=	+	+
<i>Ciclina E</i>	-	+	=
<i>Cdc25A</i>	=	+	=
<i>Rb</i>	+	=	+
<i>130 kDa Rb-associated protein</i>	=	-	+
<i>RBQ-1</i>	+	=	=
<i>RBQ-3</i>	+	-	-
<i>E2F5</i>	+	+	-
<i>CDC-like kinase 2</i>	+	+	-

Cabe remarcar que, no sólo fármacos distintos se asociaban a patrones de expresión distintos (Daunorubicina vs. WP631), sino que células tratadas un mismo fármaco tenían unos perfiles de expresión génica distintos, que dependían de la concentración (IC₇₅ vs. IC₅₀ Daunorubicina). El panel izquierdo de la Figura R25 muestra la lista de genes que se activaron o reprimieron en presencia de Daunorubicina. El panel derecho de la Figura R25 muestra que la expresión de determinados genes cambió únicamente con una de las dosis de Daunorubicina (círculos externo e interno):

36 genes con 182 nM Daunorubicina y 10 con 91 nM Daunorubicina. Por otro lado, 56 genes cambiaron con los dos tratamientos (círculo central). En este último caso, la respuesta de los genes dependía de la dosis utilizada: la transcripción de algunos genes estaba activada o inhibida con los dos tratamientos, mientras que otros genes estaban activados con una de las dosis e inhibidos con la otra, y a la inversa.

La decisión del criterio de exclusión (valor a partir del cual se considera que hay cambios en la expresión de un gen) constituye la principal dificultad del trabajo con *arrays*. Dado que se trata de una técnica semicuantitativa, la información obtenida es más fiable cuanto más se aleje el punto de corte del valor 1.0. Normalmente el punto de corte se establece en función de la relación obtenida para un gen concreto, cuyos cambios se han determinado previamente utilizando otras técnicas. En nuestro caso, resultados previos de *Northern blot* demuestran que la WP631 reduce los niveles de transcripción correspondientes a *c-myc* (Villamarín et al., 2002). Los resultados obtenidos en nuestro análisis de *arrays* demuestran que 182 nM Daunorubicina y 60 nM WP631 redujeron la transcripción de *c-myc*, mientras que ésta aumentó en presencia de 91 nM Daunorubicina (Anexo I), en clara concordancia con los resultados de RT-PCR semicuantitativa (Figura R17), de *Northern blot* (Villamarín et al., 2002) y de *Western blot* (Figura R18). En los tres casos los cambios fueron de aproximadamente 1.5 veces (véase Anexo I). Decidimos ser muy astringentes, de manera que los cambios en la expresión de *c-myc* observados quedaran fuera de los criterios de exclusión, fijando el punto de corte en 2.5 (Materiales y Métodos). De esta manera nos asegurábamos que los cambios que observáramos en otros genes, serían cambios significativos.

En aquellos casos en que las relaciones obtenidas se encontraban próximas al punto de corte, éstas podían quedar dentro o fuera del criterio de exclusión en las diferentes repeticiones del experimento. En el caso del gen *p21^{WAF1}*, los valores promedio de diferentes experimentos indicaron que los tratamientos con 182 nM Daunorubicina y 60 nM WP631 no inducían un incremento de la transcripción superior a 2 ó 2.5 veces con respecto al control (Anexo I). Sin embargo, cuando se analizaban los experimentos por separado, los cambios observados superaban el criterio de exclusión en algunos casos. En el caso del tratamiento con 91 nM Daunorubicina, el aumento de la transcripción de *p21^{WAF1}* fue de casi siete veces con respecto al control, valor superior al valor de corte, de manera que en los diferentes experimentos realizados

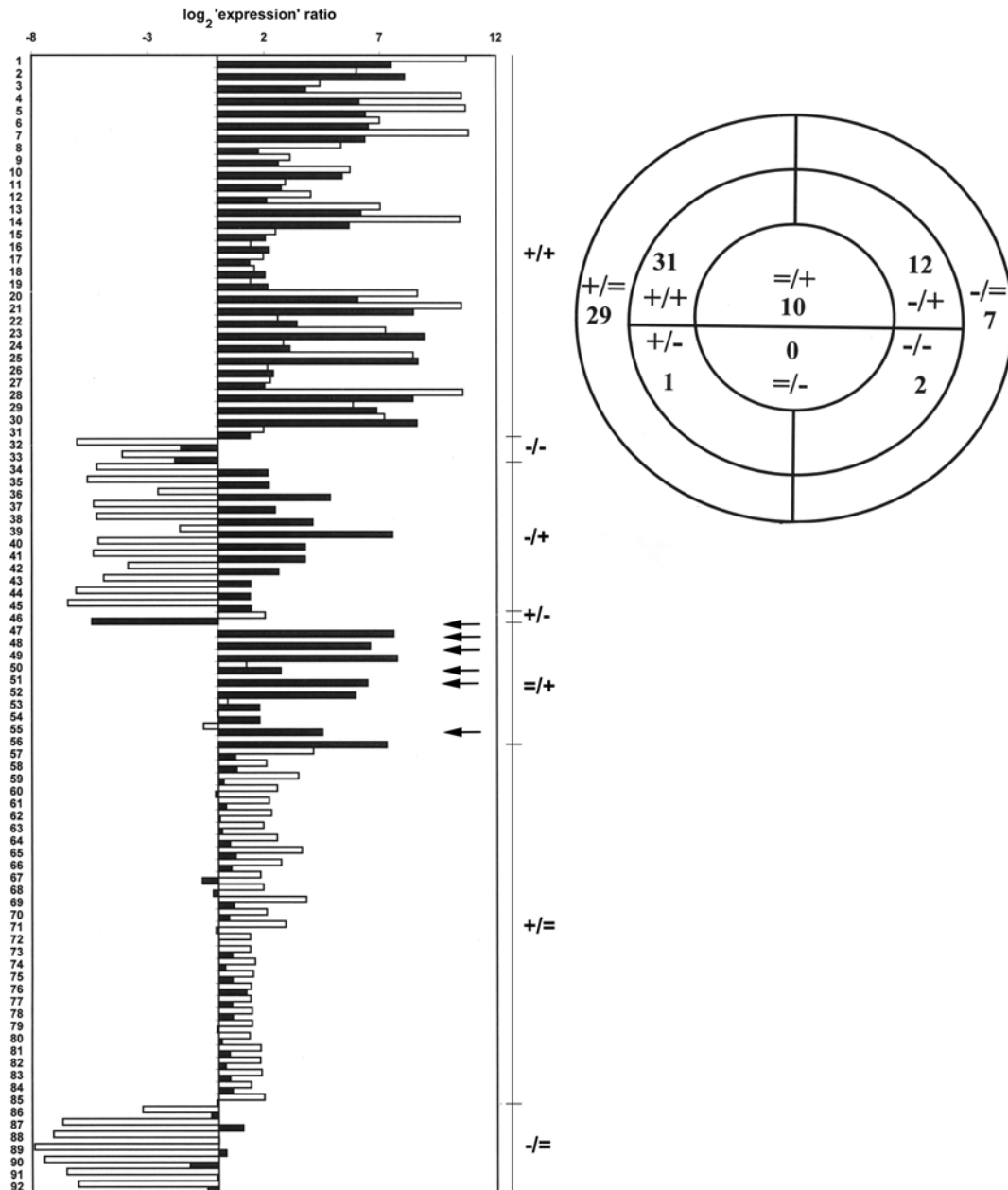


Figura R25. Análisis de la expresión génica en células Jurkat T tratadas con Daunorubicina, utilizando las membranas Human Oncogene/Tumor Suppressor Atlas Array. Los histogramas representan los genes, cuyos perfiles transcripcionales variaron, respecto al control, con las dos dosis de Daunorubicina utilizadas (IC_{50} e IC_{75}), o con una de ellas. Se expresan los cambios observados como \log_2 y los genes se agruparon en función de los cambios observados (si los cambios fueron similares con los dos tratamientos, o bien, la respuesta fue diferente, según el tratamiento). Panel izquierdo: perfiles de expresión génica en células Jurkat T tratadas con 91 nM Daunorubicina (blanco) ó 182 nM Daunorubicina (negro). Los números presentes en el eje de las coordenadas representan los genes que se indican a continuación: 1, *TGF- β receptor III*; 2, *TGF- β 2*; 3, *p53*; 4, *heregulin- β 3*; 5, *guanine nucleotide binding protein α 13 subunit*; 6, *pim-1*; 7, *Wilms' tumour protein*; 8, *ski-related oncogenesnoN*; 9, *N-myc*; 10, *DCC*; 11, *CDC25 homologue*; 12, *FOS-related antigen 2*; 13, *ATM*; 14, *PI3 kinase*; 15, *CDC-like kinase 2*; 16, *c-yes*; 17, *APC*; 18, *ETS oncogene*; 19, *E2F5*; 20, *bcl-2*; 21, *semaphorin III*; 22, *p14-INK4B*; 23, *RAD50 homologue*; 24, *neogenin*; 25, *CD100 antigen*; 26, *TGF- β signalling protein*; 27, *tyrosine kinase tnk 1*; 28, *wingless-related MMTV integration site 2 protein*; 29, *junD*; 30, *jun-B*; 31, *APC*; 32, *v-Ki-RAS2B*; 33, *STAT2, STAT113*; 34, *erbB4*; 35, *mitochondrial transcription factor 1*; 36, *p16-INK4*; 37, *CBL-B*; 38, *5T4 oncofoetal antigen*; 39, *delta lactoferrin*; 40,

siempre observamos que este tratamiento inducía el aumento de los niveles de mRNA de $p21^{WAF1}$. Mientras las reacciones de RT-PCR no nos resultaron útiles para analizar los cambios en la expresión de $p21^{WAF1}$ en las células Jurkat T tratadas con 91 nM Daunorubicina (Figura R17), la utilización de *arrays* nos ayudó a solventar el problema, confirmando los resultados de *Western blot* (Figura R18A). Esto es debido a la diferencia en la sensibilidad de las dos técnicas, en cuanto a la detección de cambios en genes que se expresan poco en las células.

Estos resultados sugieren que la información que nos ofrecían los *arrays* podía considerarse más fiable cuanto más se alejaban los valores obtenidos del punto de corte 2.5. Respecto a esta observación, es necesario remarcar que los valores obtenidos para la mayoría de genes presentados en la Tabla R6, así como otros que se presentan en el Anexo I, fueron claramente superiores o inferiores al punto de corte fijado.

FKBP-rapamycin associated protein; 41, *frizzled homologue 5*; 42, *BRCA1-associated ring domain protein 1*; 43, *RBQ3*; 44, *TATA sequence-binding protein*; 45, β 1 *catenin (CTNNB)*; 46, *cyclin E*; 47, *c-kit*; 48, *neuregulin 1*; 49, *erbB2*; 50, *tight junction protein 1*; 51, *Rb*; 52, *integrin-linked kinase*; 53, *RBQ1*; 54, *semaphorin III/F*; 55, *wingless related MMTV integration site 8b protein*; 56, *neurofibromatosis protein type 1*; 57, *neural retin-specific leucine zipper protein*; 58, *MCC*; 59, *c-abl*; 60, *raf1*; 61, *prohibitin*; 62, *cyclin D3*; 63, *Cdc25A homologue*; 64, *ski*; 65, *TBP-associated factor 250 kDa subunit*; 66, *p21/WAF1*; 67, *guanine nucleotide regulatory protein tim 1*; 68, *nuclease-sensitive element DNA-binding protein*; 69, *c-fgr*; 70, *L-myc*; 71, *prefoldin 4*; 72, *c-kit ligand*; 73, *X-ray repair-complementing defective repair in Chinese hamster cells*; 74, *receptor interacting protein*; 75, *transducer of erbB2*; 76, *B-raf*; 77, *prefoldin 5*; 78, *smoothed homologue*; 79, β -*catenin*; 80, *ZAP70*; 81, *CDC-like kinase 3*; 82, *neurogenic locus notch protein homologue 1*; 83, *CDC2-related protein CHED*; 84, *N-Ras*; 85, *SAP102*; 86, *rel A*; 87, *130 kDa Rb-associated protein*; 88, *PCTAIRE 3*; 89, *mdmx*; 90, *frizzled-related FrzB*; 91, *ABL2*; 92, *tumour necrosis factor receptor superfamily member 10B*. La función de estos genes puede encontrarse en la dirección <http://www.clontech.com/atlas> y en el Anexo I presentado en esta memoria. Las barras señaladas con una flecha corresponden a cambios cualitativos. Panel derecho: diagrama que agrupa los genes en función a la repuesta observada con las diferentes dosis de Daunorubicina. Los círculos externo e interno muestran los genes, cuya expresión varió únicamente con 182 nM Daunorubicina ó 91 nM Daunorubicina, respectivamente. El círculo central muestra aquellos genes, cuyo perfil de expresión varió con las dos dosis. +, activación de la transcripción, -, inhibición de la transcripción, =, sin cambios en la transcripción, respecto al control. En el círculo central, el signo de la izquierda representa los cambios en presencia de 91 nM Daunorubicina, y el de la derecha, los cambios observados con la dosis de 182 nM Daunorubicina.

Otro dato interesante que obtuvimos es el cambio en la expresión del gen *p53*, clave en el control de la progresión del ciclo celular, la apoptosis, y cuya pérdida funcional está relacionada con la catástrofe mitótica (Bunz et al., 1998). La Tabla R6 muestra que los dos tratamientos con Daunorubicina indujeron la activación de la transcripción de *p53*, mientras que ésta estaba inhibida en presencia de 60 nM WP631. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura R17). En los datos presentados en el Anexo I se puede comprobar que, en los tres casos, el cambio en la expresión de *p53* fue mucho mayor de 2.5 veces con respecto al control: la activación de la transcripción fue unas 14 veces superior con el tratamiento con 182 nM Daunorubicina y más de 20 veces superior en presencia de 91 nM Daunorubicina, mientras que el nivel transcripcional se redujo más de 18 veces con respecto al control en presencia de 60 nM WP631.

Dado que el gen *p53* actúa como “guardián del genoma”, detectando lesiones en el DNA y activando vías de reparación, progresión celular o apoptosis, decidimos analizar si los diferentes fármacos y dosis inducían la rotura del DNA, como consecuencia de la interferencia con el corte-religado de la topoisomerasa II o la producción de radicales libres, por ejemplo. Cuantificamos la fragmentación del DNA de células Jurkat T tratadas con 182 ó 91 nM Daunorubicina, o 60 nM WP631 durante 4 y 10 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla R7. La fragmentación del DNA aumentó significativamente con el tiempo únicamente con la dosis 182 nM Daunorubicina, resultado que podría explicar, al menos en parte, que este fuera el único tratamiento asociado a la muerte mayoritaria de las células por apoptosis.

Tabla R7. Cuantificación de la fragmentación del DNA intracelular en células Jurkat T tratadas con dos dosis diferentes de Daunorubicina o WP631, durante 4 ó 10 horas. La cuantificación se realizó mediante un ensayo colorimétrico que determinó la cantidad de BrdU que quedaba accesible en el DNA (fragmentado). Se representa el valor promedio y la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes. (n.d, no determinado).

	Daunorubicina		WP631			
	182 nM		91 nM		60 nM	
	4 h	10 h	4 h	10 h	4 h	10 h
% daño DNA	26.3 ± 3.1	37.8 ± 4.4	7.4 ± 5.2	7.2 ± 6.0	4.8 ± 3.9	n.d

4. 13. ANÁLISIS *IN VIVO* (CÉLULAS EN CULTIVO) DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE Sp1 POR WP631

Muchos de los genes presentes en las membranas Human Oncogene & Tumor Suppressor Atlas Array se encuentran bajo control transcripcional del factor de transcripción Sp1. Aunque la WP631 es un inhibidor muy potente de la transcripción dependiente de Sp1 (Botella et al., 2001; Gaidarova and Jiménez, 2002; Martín et al., 1999; Portugal et al., 2001; Villamarín et al., 2002), los resultados obtenidos usando *macroarrays* (ver apartado 4.12.) demuestran que la interpretación de los resultados se complica cuando las condiciones del ensayo son más complejas. Dado que todos los genes analizados forman parte de cascadas génicas y la efectividad de la WP631 depende de varios factores, que se analizarán en detalle en la Discusión, resulta muy difícil conocer *a priori* el efecto de la WP631 sobre un gen concreto, esté regulado o no por Sp1. Por este motivo se realizó un análisis *in vivo* (cultivos celulares) con el fin de diseccionar directamente los efectos de la WP631 sobre el factor Sp1. Se comprobó si la misma dosis de WP631 que provocó la muerte de las células Jurkat T por catástrofe mitótica (60 nM, su IC₇₅) era capaz de inhibir la transcripción dependiente de Sp1 en células en cultivo.

En estos experimentos, transfectamos células Jurkat T con vectores conteniendo el gen *reporter* CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) bajo el control transcripcional de los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT1 (Figura M8). Se analizaron los efectos de la WP631, y de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 (endógenos y sobreexpresados) sobre estos promotores.

4.13.1. Determinación de los efectos de diferentes dosis de WP631 sobre el crecimiento de células Jurkat T

En primer lugar se determinaron las condiciones óptimas para realizar los experimentos. Se trataron células Jurkat T con tres concentraciones diferentes de WP631 (60 nM, 600 nM y 1 μ M) durante 4 ó 24 horas. Se analizó la viabilidad y la proliferación en cada uno de los casos. Las Figuras R26A y R26B muestran los resultados del recuento de viabilidad, utilizando el colorante azul de tripano, y la proliferación celular, determinada mediante el ensayo del MTT de células tratadas. Se puede observar que, mientras que todos los tratamientos se asociaron a una elevada viabilidad (entre el 87-98%), sólo los tratamientos realizados durante 4 horas permitieron una proliferación aproximada al

100%, comparable a las células sin tratar. Sin embargo, únicamente en las células tratadas con 60 nM WP631 durante 24 horas, la proliferación celular fue cercana al 100%, mientras tratamientos durante 24 horas con dosis superiores (600 nM y 1 μ M) provocaron la disminución de la proliferación celular (~ del 56% y el 40% respecto a las células sin tratar respectivamente). Debido a que el porcentaje de células en proliferación decreció con las dosis más elevadas de WP631 durante los tratamientos de 24 horas, analizamos la distribución del ciclo celular asociada a cada tratamiento, para determinar si se producía alguna alteración. En tratamientos de 4 horas, la distribución del ciclo celular fue comparable a las células sin tratar (Figura R26C). Sin embargo, la distribución del ciclo celular fue similar a las células control, solamente con el tratamiento con 60 nM WP631 después de 24 h de tratamiento. Los tratamientos con 600 nM y 1 μ M WP631 provocaron la acumulación de las células en la fase G₂/M a las 24 horas. De estos resultados se deduce que el tratamiento de las células Jurkat T con 60 nM WP631 no afecta a la distribución del ciclo celular a las 24 horas de tratamiento aunque, según resultados explicados previamente, después de 72 horas de tratamiento, las células se acumularon en G₂/M y formaron poliploidías, y murieron por catástrofe mitótica (Figuras R3, R9, R13 y R14). Los tratamientos con 600 nM y 1 μ M WP631 provocaron los mismos efectos, aunque se manifestaron ya a partir de las 24 horas de tratamiento (Figura R26C).

Se planteó, en consecuencia, que los experimentos se deben realizar utilizando células tratadas con WP631 que proliferaran con normalidad, ya que de lo contrario, los niveles de proteínas Sp1 y Sp3 endógenos podrían ser diferentes respecto a las células sin tratar, dificultando su comparación y la interpretación de los resultados. Por este motivo, y en función a los resultados mostrados anteriormente, en los ensayos se usaron células tratadas durante 4 horas con 60 nM, 600 nM y 1 μ M WP631 y células tratadas con 60 nM WP631 durante 24 horas.

Se determinó también el momento idóneo en que se podían iniciar los tratamientos con WP631 después de haber transfectado las células con los diferentes vectores (descritos en Materiales y Métodos). Se realizó el seguimiento de la viabilidad celular a lo largo del tiempo (0, 24 y 48 horas), mediante una tinción con azul de tripano, de las células transfectadas. Inmediatamente después de la transfección sobrevivieron, aproximadamente, la mitad de las células, cuya viabilidad 24 horas después fue del 80%. Después de 48 horas post-transfección, la viabilidad promedio fue

de un 95%, valor comparable a la viabilidad media justo antes de transfectar. Para que la interpretación de los resultados fuera correcta, los diferentes experimentos tenían que realizarse en el momento en que las células transfectadas con los vectores de expresión comenzaran a experimentar cambios en los niveles de proteína Sp1 y/o Sp3. Los experimentos de *Western blot* indicaron que los cambios los niveles de proteínas podían observarse a partir de las 24 horas de las transfecciones (Figura R27).

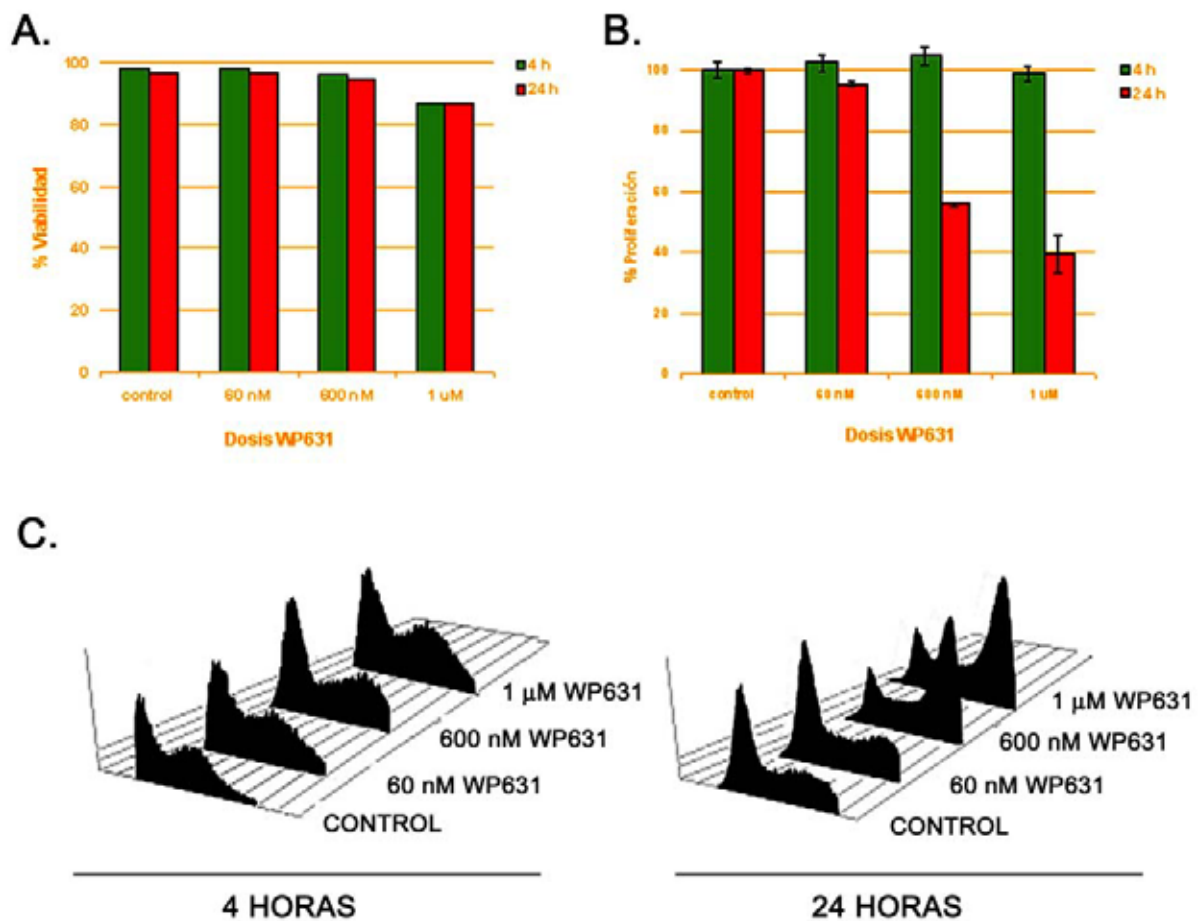


Figura R26. Viabilidad, proliferación y distribución del ciclo celular en células Jurkat T tratadas durante 4 ó 24 horas con diferentes concentraciones de WP631 (60 nM, 600 nM y 1 µM). (A) Recuento de la viabilidad, mediante una tinción con azul de tripano, de células Jurkat T tratadas con WP631. Ninguno de los tratamientos indujo un aumento significativo de la mortalidad celular. (B) Ensayo de proliferación, basado en la capacidad de las células tratadas con WP631 para metabolizar el MTT. Los tratamientos durante 24 horas con 600 nM y 1 µM WP631 provocaron la inhibición de más del 39% de la proliferación celular. (C) Variaciones en la distribución del ciclo celular en presencia de diferentes dosis de WP631. A las 24 horas de tratamiento continuo con WP631, solamente las células tratadas con la dosis de 60 nM tenían una distribución comparable a las células control.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió transfectar las células, subcultivarlas y mantenerlas durante 24 horas (momento en que se detectaron los cambios en los niveles de Sp1 y Sp3). En este momento se realizaron tratamientos de 24 horas con las diferentes dosis de WP631. Se descartaron los tratamientos de 4 horas, ya que únicamente el tratamiento de 24 horas se extendía hasta las 48 horas post-transfección, momento en que la viabilidad celular fue cercana al 100%.

Una vez se determinaron las condiciones óptimas para los experimentos se analizó la capacidad de la Bisantraciclina WP631 para competir y desplazar al factor de transcripción Sp1 de su lugar de unión en el promotor de GLUT1, realizando tres tipos de experimentos. En primer lugar se determinó la capacidad de la WP631 para competir con los factores de transcripción Sp1 y Sp3 endógenos. En segundo lugar sobreexpresamos las proteínas Sp1 y/o Sp3 para conseguir diferentes relaciones Sp1/Sp3, y determinar los efectos de la WP631 sobre la transcripción dependiente de Sp1. Finalmente, se realizaron diferentes ensayos de retardamiento en gel (*Band-Shift*) con el fin de monitorizar las diferencias en cuanto a afinidad de unión del factor Sp1 y la Bisantraciclina WP631 a las secuencias promotoras wtGLUT1 y mut2GLUT1.

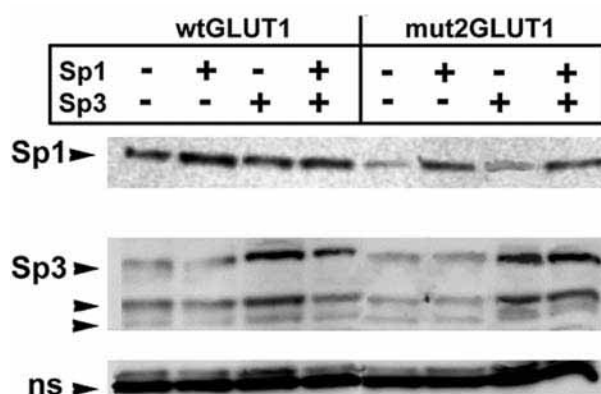


Figura R27. *Western blot* que muestra los cambios en los niveles de las proteínas Sp1 y Sp3 en células Jurkat T transfectadas con los vectores wtGLUT1 o mut2GLUT1, y en presencia/ausencia de los vectores pCMV-Sp1 y/o pCMV-Sp3flu. Se muestran las bandas correspondientes al factor de transcripción Sp1 y a las tres isoformas del factor Sp3. Se utilizó una banda inespecífica de 45 kDa, que resultaba de la reacción cruzada con el anticuerpo anti-Sp3, como control interno. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

4.13.2. La WP631 inhibe la activación de los promotores GLUT1 dependiente de la maquinaria transcripcional endógena

En la Figura R28 (barras wt y mt) se muestra la actividad CAT relativa dirigida por los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT1, bajo control de la maquinaria transcripcional endógena de las células Jurkat T (Sp1 y Sp3 endógenos). Aunque no hubo diferencias significativas entre los dos promotores, observamos que en la mayoría de experimentos existía una tendencia a que la expresión del gen *reporter* CAT bajo el control del promotor wtGLUT1, fuera más potente que en el caso del promotor mut2GLUT1.

El tratamiento de los cultivos con 60 nM WP631 provocó un 30% de inhibición en la actividad CAT, bajo control de los promotores wtGLUT1 y mutGLUT1, respecto a las células sin tratar (barra wt *vs.* wt+W y mt *vs.* mt+W). De estos resultados se deduce que la WP631 compite con los factores Sp1 y Sp3 endógenos, con una eficiencia casi idéntica para los dos promotores.

4.13.3. La WP631 inhibe la activación de los promotores GLUT1 de manera diferencial cuando se sobreexpresa Sp1 y/o Sp3

Cuando se sobreexpresó Sp1, la actividad CAT relativa dependiente del promotor wtGLUT1, no varió significativamente respecto a la actividad inducida por el factor Sp1 endógeno (Figura R28, barra wt *vs.* a). En el caso del promotor mut2GLUT1, aunque las diferencias observadas entre la actividad dirigida por el factor Sp1 endógeno o sobreexpresado no fueron significativas (barra mt *vs.* c), se puede observar que, en promedio, la actividad CAT aumentó al sobreexpresar Sp1 resultando en una activación relativa similar a la del promotor wtGLUT1 (barras wt y mt *vs.* barras a y c). Estos resultados indican que el factor de transcripción Sp1 endógeno es suficiente para la activación máxima del promotor wtGLUT1, por este motivo la sobreexpresión del factor de transcripción no alteró la actividad CAT relativa. Sin embargo, parece que los niveles de Sp1 endógenos no fueron suficientes para saturar la respuesta dirigida por el promotor mut2GLUT1, ya que no se alcanzaron valores de actividad CAT comparables a wtGLUT1 hasta que se sobreexpresó Sp1.

A diferencia de lo que ocurría con el factor Sp1 endógeno, cuando se sobreexpresó Sp1 y se trataron las células con 60 nM WP631, la capacidad de inhibición de la transcripción de la Bisantraciclina fue diferente para cada promotor (barras b y d). Mientras que la inhibición la actividad CAT relativa seguía siendo de un

30% para el promotor wtGLUT1 en células tratadas con WP631 (barras wt vs. a y barras wt+W vs. b), la capacidad de la WP631 para inhibir la transcripción dirigida por el promotor mut2GLUT1 pasaba del 30% al 100% cuando el factor de transcripción Sp1 estaba sobreexpresado. De estos resultados se deduce que el efecto de la WP631 es más potente sobre la transcripción del promotor mut2GLUT1, que contiene la secuencia CGTACG, lugar de unión de alta afinidad de la Bisantraciclina (Chaires et al., 1997) cuando su activación es máxima.

La sobreexpresión del factor de transcripción Sp3 indujo la reducción de la actividad CAT relativa dirigida por el promotor wtGLUT1 por debajo de los niveles “basales”, determinados por los factores Sp1 y Sp3 endógenos (Figura R28, barras wt vs. e). Estos resultados indican que, cuando se sobreexpresa Sp3, se establece una competencia por el lugar de unión en el promotor wtGLUT1, que resulta en la represión de la actividad CAT relativa. Por otro lado, resultó sorprendente que la actividad CAT dirigida por el promotor mut2GLUT1, que carece de lugares de unión funcionales para Sp3 (Fandos et al., 1999), fuera inferior a la actividad “basal” (barras mt vs. g). Para explicar este comportamiento, cabe postular que la sobreexpresión de Sp3 podría inhibir la transcripción del promotor mut2GLUT1 por mecanismos independientes a su unión al DNA. Por ejemplo, la presencia de proteína Sp3 “extra” podría secuestrar al factor Sp1 endógeno (fenómeno de *snatching*), reduciendo la concentración de Sp1 capaz de unirse al promotor.

Como era de esperar, que la sobreexpresión de Sp3 en la presencia de 60 nM WP631 reprimió completamente la actividad de los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT1 (Figura R28, barras e y g vs. barras f y h). Estos resultados confirman que, aunque la sobreexpresión de Sp3 condujera a un “estado reprimido” (valores CAT inferiores a los valores “basales”), los promotores continuaban manteniendo la capacidad de responder a la presencia de WP631, resultando en un estado de mayor represión.

La cotransfección de los vectores de expresión de Sp1 y Sp3 provocó la reducción de la actividad CAT dirigida por el promotor wtGLUT1 (barra i) respecto a la actividad basal (barra wt) e inducida por la sobreexpresión de Sp1 (barra a). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Sp1 y Sp3 provoca un estado parcialmente reprimido de la actividad transcripcional del promotor wtGLUT1 debido a que el factor Sp3 compite con Sp1 por el lugar de unión en el DNA (barra e vs. barra i). En este caso

la WP631 no inhibió eficientemente la transcripción dirigida por wtGLUT1 (barra i vs. j). Por otro lado, como el promotor mut2GLUT1 presenta una mutación que impide la unión del factor Sp3 (Fandos et al., 1999), cabía esperar que los resultados derivados de sobreexpresar Sp1 y Sp3, o únicamente Sp1, fueran equivalentes, tanto en presencia como en ausencia de WP631. Los resultados presentados en la Figura R28 (barras k y l) confirmaron nuestra hipótesis. La comparación de las barras c y k corrobora que no hubo diferencias significativas en la actividad CAT relativa dirigida por el promotor mut2GLUT1, confirmando que en este promotor la secuencia de unión para Sp3 está cancelada. De la misma manera, si se comparan las barras d y l, se puede observar que, la inhibición de la transcripción dirigida por el promotor mut2GLUT1 fue equivalente.

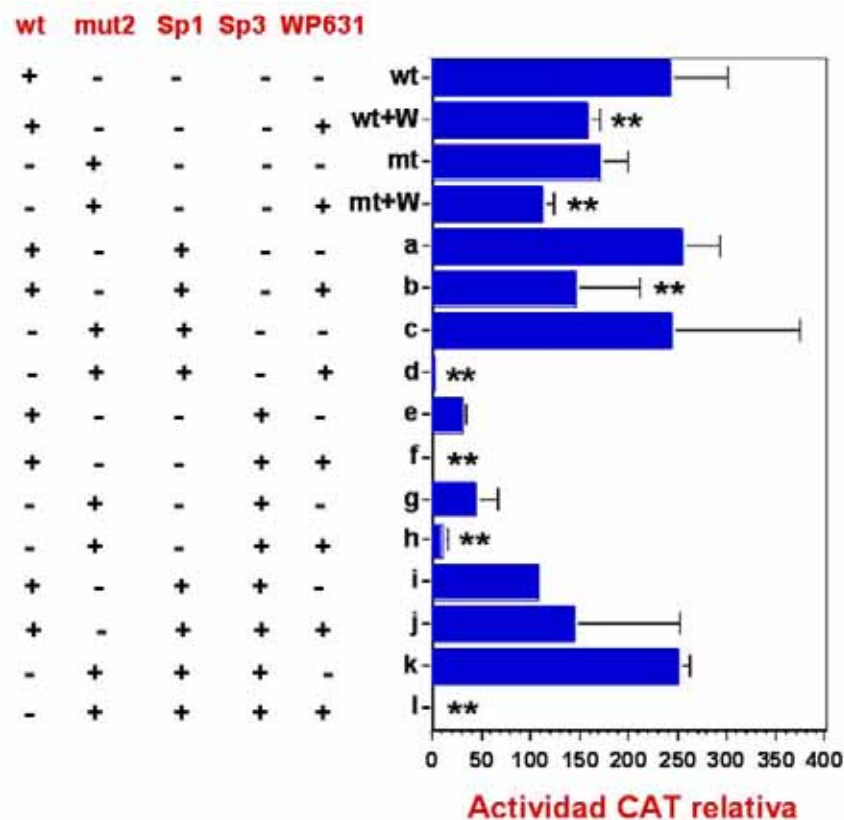


Figura R28. Inhibición de la transcripción dependiente de Sp1/Sp3 por la WP631. Se muestran los efectos de los factores de transcripción Sp1 y Sp3, y de la WP631 sobre la actividad transcripcional bajo control de los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT2, transfectados en células Jurkat T. Se determinó la actividad del gen *reporter* CAT, clonado detrás de los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT2, y se normalizó la eficiencia de las transfecciones, utilizando un segundo gen *reporter*, la β -galactosidasa. La actividad transcripcional, obtenida en cada caso, se expresa como actividad CAT relativa (CAT/ β -galactosidasa). Se representan los valores promedio y las desviaciones estándar de 3-4 experimentos independientes. Se indican las diferencias en la actividad CAT relativa que fueron estadísticamente significativas en presencia de la WP631 (** test t-Student, $p < 0.05$).

4.13.4. La eficiencia de la WP631 desplazando al factor de transcripción Sp1 de los promotores wtGLUT y mut2GLUT1 es diferente

La Figura R29 muestra los resultados de los análisis de retardamiento en gel (*Band-Shift*) de la unión de la proteína Sp1 recombinante a fragmentos de 62 pb obtenidos a partir de los promotores wtGLUT1 o mut2 GLUT1, que contienen la región de unión de Sp1 y WP631. Un primer análisis demostró que, aunque la cancelación del lugar de unión para Sp3 en el promotor mut2 no eliminaba la secuencia de unión para Sp1, la unión del factor de transcripción a la secuencia silvestre era unas cinco-seis veces más fuerte (Figura R29). Este resultado indica que Sp1 es capaz de interaccionar y unirse al promotor mut2 pero con menor afinidad que para la secuencia silvestre del promotor wtGLUT1. Este resultado está de acuerdo con estudios sobre la unión de Sp1 a cada promotor (Fandos et al., 1999),

El efecto de la WP631 sobre el promotor mut2, que contiene la secuencia CGTACG, de alta afinidad para la Bisantraciclina, es mayor al que se observa para el promotor salvaje (Figuras R29A, R29B y R29C). La dosis 600 nM WP631 inhibió un 39% la formación del complejo Sp1-wtGLUT1, mientras que la misma concentración de fármaco inhibió casi totalmente la formación del complejo equivalente para el promotor mut2 GLUT1 (Figura R29A). Las figuras R29B y R29B muestran diferentes ejemplos de análisis de retardamiento en gel donde se analiza, en mayor detalle, la capacidad de la WP631 de inhibir la unión de Sp1 a las regiones promotoras de GLUT1 salvaje y mut2. Se puede observar cómo se requieren menores concentraciones de WP631 para inhibir la formación de complejos Sp1-mut2GLUT1. La dosis de WP631 que inhibe el 50% de la formación de complejos Sp1-wtGLUT1 es superior a 600nM, mientras que dosis menores, aproximadamente 297 nM, ejercen el mismo efecto sobre el promotor mutado mut2GLUT1. Estos resultados están en consonancia con las diferencias en la capacidad de la WP631 para inhibir la transcripción de cada uno de los dos promotores (apartados 4.13.2 y 4.13.3)

RIV. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS DE DIANAS POTENCIALES PARA LA WP631 EN DIFERENTES PROMOTORES HUMANOS

Se llevó a cabo un estudio teórico con la finalidad de comparar las frecuencias observadas de las dianas potenciales de las Antraciclinas monoméricas y la WP631, con

las frecuencias esperadas en caso de distribución de los nucleótidos al azar. El análisis se realizó sobre 26 promotores, correspondientes a diferentes genes involucrados en el control del ciclo celular.

4.14. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE SECUENCIAS RICAS EN CITOSINA- GUANINA EN PROMOTORES HUMANOS

La Tabla R8 muestra la composición de las regiones promotoras analizadas, así como de una secuencia de 1000 pb generada al azar, y el DNA satélite rico en A+T del coleóptero *Pimelia sparsa sparsa* (Barceló et al., 1997). El estudio teórico mostró que la riqueza de los diferentes tramos ricos en C+G y del número total de pasos CpG a lo largo de los diferentes promotores es heterogénea.

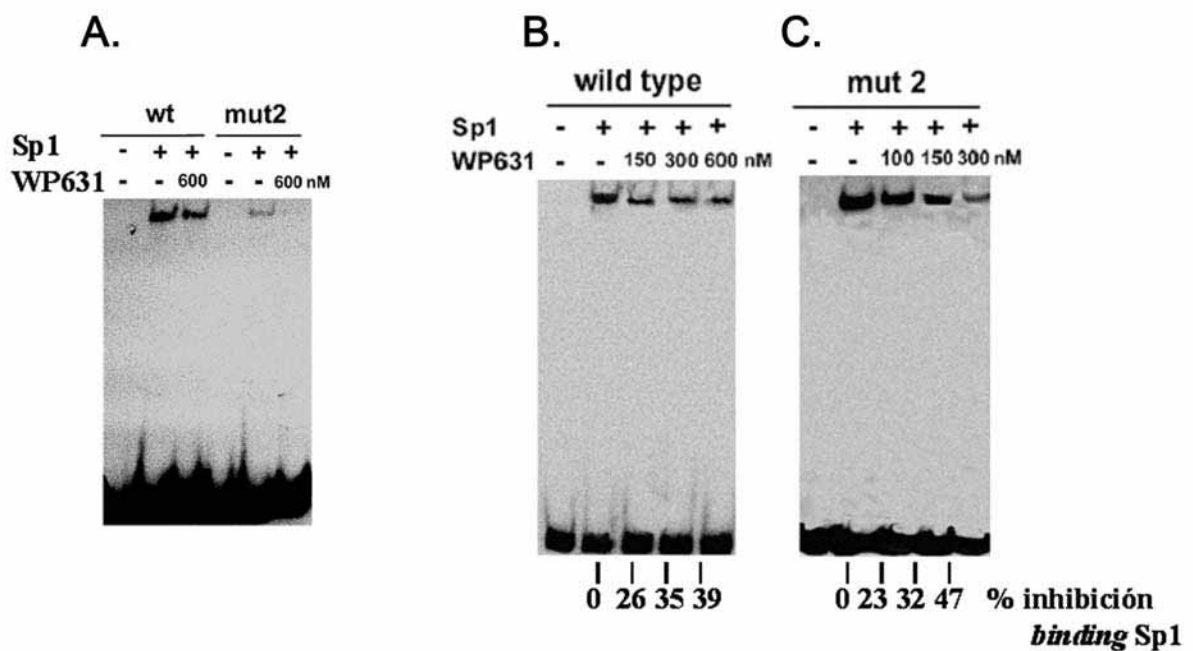


Figura R29. Efecto de la WP631 sobre la unión del factor de transcripción Sp1 a los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT1. Se obtuvo el fragmento de 62 pb que contiene la secuencia de unión de Sp1 y la Bisantraciclina, mediante doble digestión con *HindIII* y *Avall* y se realizaron diferentes ensayos de retardamiento en gel. (A) Ensayo de retardamiento en gel donde se confirma que la unión del factor Sp1 al promotor wtGLUT1 es más potente, y que WP631 es más eficaz inhibiendo la formación de complejos Sp1-mut2GLT1. (B, C) Ensayos de retardamiento en gel que demuestran que la concentración de WP631 necesaria para inhibir la formación de complejos Sp1-DNA es menor en el caso del promotor mut2GLUT1, que contiene la secuencia CGATCG, de alta afinidad para la Bisantraciclina. Se indican los porcentajes de inhibición de la formación de complejos Sp1-DNA en presencia de diferentes concentraciones de WP631 (valores promedio obtenidos a partir de 2 experimentos independientes).

En la mayoría de los promotores, las frecuencias observadas para el dinucleótido CG (CpG) (lugar de unión de la Daunorubicina y la Doxorubicina) y la secuencia 5'CGNNCG'3 (lugar de unión de la WP631) se alejan mucho de las frecuencias que se esperarían asumiendo una distribución al azar de los nucleótidos (Figura R30). Esta desviación predomina en promotores correspondientes a genes implicados en la regulación del ciclo celular (Paneles C y D), en vías de transducción de la señal mitogénica (Paneles E y F) y, en algunos genes supresores de tumores o reguladores de la apoptosis (Paneles G y H). En la mayoría de estos promotores, el total de pasos CpG y tramos 5'CGNNCG'3 reales (observados) se encuentra infrarrepresentado respecto a los valores esperados. Por el contrario, la distribución de los tramos CpG en los promotores de diferentes oncogenes (Panel A) es próxima a la esperada en caso de azar. Lo mismo ocurre cuando se analiza la composición en cuanto a tramos 5'CGNNCG'3 (Panel B), salvo para los promotores de *erbB3* y *jun* donde, sorprendentemente, el hexanucleótido se encuentra representado muchas más veces de lo que se esperaría si hubiera distribución al azar.

De los resultados mostrados en la Figura R30 se desprende que la distribución de las diferentes secuencias a lo largo de los promotores no es al azar. Por otro lado, a medida que aumenta la longitud del tramo analizado (CGNNCG frente a CpG), la frecuencia con la que se encuentra esta secuencia todavía se aleja más de los valores esperados.

Estas diferencias se hacen más evidentes cuando se definen los nucleótidos centrales del tramo 5'CGNNCG'3. Se observó que las secuencias 5'CGCCCG'3 y 5'CGGGCG'3 aparecen una o dos veces en la mayoría de promotores, mientras que en otros muchos casos ni se observan (Tabla R8). Un claro ejemplo es el promotor *jun* que, a pesar de contar con un total de 11 tramos 5'CGNNCG'3, sólo presenta 2 secuencias 5'CGGGCG'3. Algo parecido ocurre con el promotor *erb-b3*, en el cual no se observa ningún tramo 5'CGGGCG'3 aunque presenta 8 tramos 5'CGNNCG'3.

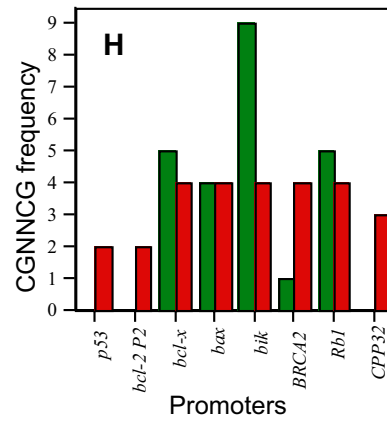
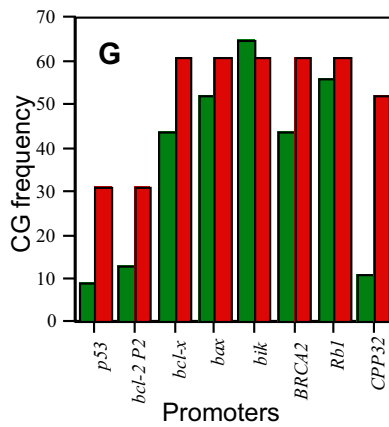
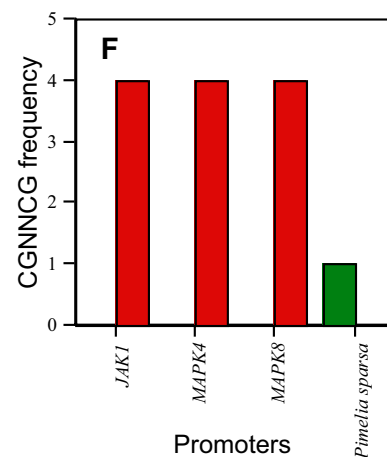
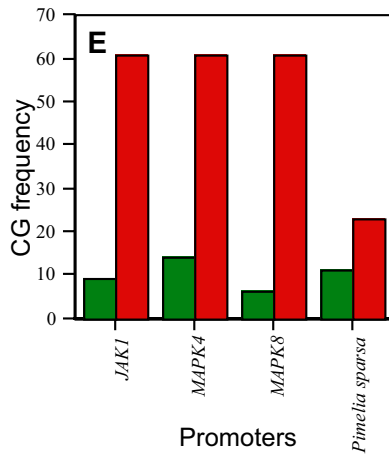
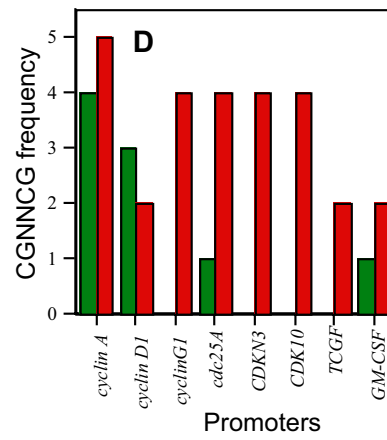
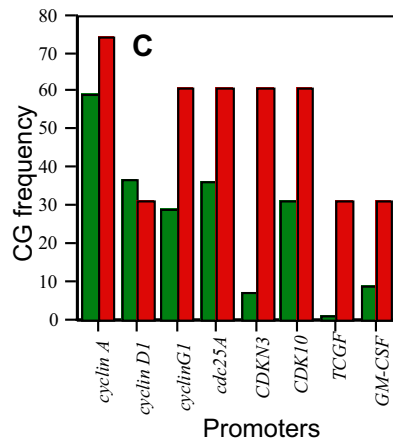
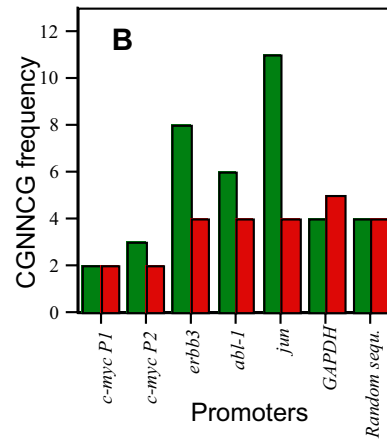
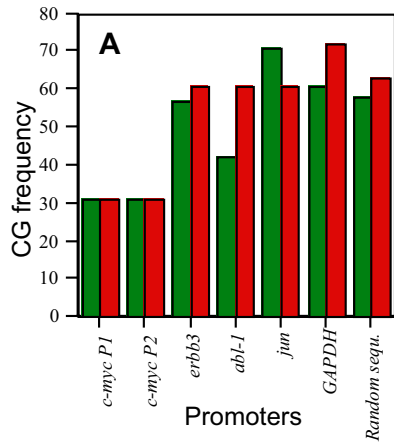
En ninguno de los promotores analizados se ha encontrado el hexanucleótido 5'CGA/T/AAG'3, secuencia donde preferentemente se bisintercala la Bisantraciclina WP631 (Hu et al., 1997). Cuando se analizó la frecuencia con la que aparece otra de las secuencias de unión de la WP631, el hexanucleótido 5'GCCGCG'3 (Tabla R8), se observó que ésta es mucho menor que las observadas para los tramos 5CGCCCG'3 o

5'CGGGCG'3, siendo nula en 22 de las 26 secuencias estudiadas. De los 11 tramos 5'CGNNCG'3 del promotor de *jun*, sólo uno corresponde a la secuencia CGCGCG.

Tabla R8. Composición, frecuencias observadas de diferentes tramos ricos en CpG y presencia de lugares de unión potenciales del factor activador de la transcripción Sp1 en los 26 promotores humanos analizados y dos controles externos de robustez estadística.

PROMOTOR	pb	% C/G	CpG	CGNNCG	CGCCCCG	CGGGCG	CGCGCG	CGGGGCG	Sitios Sp1 ^(a)
c-myc P1	501	58.9	31	2	0	0	2	0	+
c-myc P2	501	59.1	31	3	0	0	1	0	+
abl-1	968	51.0	42	6	0	0	4	0	+
BRCA2	968	55.0	44	1	0	0	0	0	+
erb-b3	968	63.5	57	8	1	0	1	1	+
Jun	968	64.4	71	11	2	2	1	0	+
p53	501	41.9	9	0	0	0	0	0	-
Rb1	968	54.0	56	5	0	2	0	0	-
bcl-2 P2	501	39.5	13	0	0	0	0	0	-
Bax	968	55.8	52	4	1	1	1	1	-
Bik	968	61.6	65	9	3	2	0	2	+
bcl-x	968	57.5	44	5	0	2	0	0	+
CPP32	839	47.9	11	0	0	0	0	0	-
ciclina D1	501	65.9	37	3	2	0	0	1	+
ciclina G1	968	45.1	29	0	0	0	0	0	-
ciclina A	1180	46.0	59	4	0	1	0	0	+
CDK10	968	63.2	31	0	0	0	0	0	-
Cdc25A	968	55.3	36	1	1	0	0	1	+
CDKN3	968	41.8	7	0	0	0	0	0	+
MAPK4	968	47.9	14	0	0	0	0	0	-
MAPK8	968	33.9	6	0	0	0	0	0	-
JAK1	968	42.1	9	0	0	0	0	0	+
TCGF	501	33.9	1	0	0	0	0	0	-
GM-CSF	501	54.0	9	1	0	1	0	0	+
DHFR	501	73.9	54	9	2	3	0	2	+
GAPDH	1149	65.1	61	4	1	1	0	0	+
P. sparsa s.	365	33.1	11	4	0	0	0	0	-
Secuencia azar	1000	50.8	58	0	0	1	0	0	-

^(a) Se utilizó el programa de predicción TESS (Transcription Element Search Software), accesible en la página <http://www.cbil.upenn.edu/tess>, para la detección de sitios potenciales de unión del factor de transcripción Sp1 en las regiones promotoras analizadas.



Al analizar la presencia de un tramo rico en CpG más largo, por ejemplo la secuencia de 7pb 5'CGGGGCG'3, la frecuencia con la que aparece en los promotores también es menor a la esperada (Tabla R8)é Los promotores correspondientes a los genes *bik* y *DHFR* presentan dos veces esta secuencia, mientras que ésta se encuentra una única vez en los promotores *erb-b3*, *bax*, *ciclina D1* y *cdc25A* (Tabla R8).

Los resultados obtenidos demuestran que, en general, las dianas potenciales de unión para las Antraciclinas (tramos ricos en CpG) están infrarrepresentadas en la mayoría de los promotores humanos analizados. Cuanta mayor longitud tienen estas secuencias, menor es la probabilidad de encontrarlas en los promotores. Las dianas potenciales de unión para la WP631 (CGNNCG y CGNNNCG) se encuentran menos veces representadas que las dianas de unión para la Daunorubicina y la Doxorubicina (CpG).

Dado que el factor de transcripción Sp1 reconoce determinadas secuencias del DNA ricas en C+G, la Bisantraciclina WP631 actúa principalmente inhibiendo la transcripción dependiente Sp1 (Resultados y (Martín et al., 1999)). Por este motivo, los efectos de la WP631 sólo tendrían lugar cuando sus dianas potenciales coincidieran con la presencia de un lugar de unión para el factor Sp1, o bien fueran adyacentes. De los 26 promotores analizados, 16 presentan sitios potenciales para Sp1 como *abl-1*, *BRCA2*, *erb-b3*, *cdc25A* y *jun* (Tabla R8). En la Figura R31 se indica, a modo de ejemplo, la presencia y localización de los diferentes tramos ricos en CpG y de los lugares de unión potenciales del factor Sp1 en los promotores de los genes *BRCA2*, *ciclina D1* y *jun*. Por otra parte, la presencia de regiones heterocromáticas (regiones génicas inactivas) hace que la frecuencia de las dianas, sobre las que la WP631 podría ejercer un efecto sobre la transcripción, sea mucho menor que la que cabe esperar en el caso de que los nucleótidos estuvieran distribuidos al azar. Esto implica el aumento de la especificidad relativa de la WP631, comparada con otros fármacos que se unen al DNA.

Figura R30. Representación gráfica de la presencia de pasos CpG (paneles A, C, E y G) y tramos CGNNCG (paneles B, D, F y H) en las regiones promotoras analizadas. En verde: frecuencias observadas, en rojo: frecuencias esperadas, calculadas tal como se indica en Materiales y Métodos. A y B: promotores de oncogenes y *GAPDH*, más la secuencia de DNA obtenida al azar. C y D: promotores de genes implicados en el control del ciclo celular. E y F: promotores correspondientes a genes implicados en transducción de señal, más el DNA satélite de *Pimelia sparsa sparsa* (rico en A+T). G y H: promotores de genes supresores de tumores y de genes implicados en apoptosis.

A.

```

-80 | -70 | -60 | -50 | -40 | -30 | -20 | -10 |
-934 | | | CGAA TCCTAAGAAT GCAAAAAGATG GGCTGGGTGT GGTGGCTCAT GCCTGTAATC -881
-880 CCAGCGCTTT GGGAGGCCGA GGCAGGCAGA TCACCTGAGG TCGGGAGGTT GAGACCAGAC TGACCAACAA CGGAGAAACC -801
-800 CCGTCTCTAC TTAAAAATGC AAAGTTAGCC GTGGCTGGTG GCCCATGCCT GTATTCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA -721
-720 GGAGAACCAC TTGATCCCTG GAGGCGGAAG TTGCGGTGAG CGGAGATTGC GCCATTGCAC ACCAGCCCCG GCCACAAGAG -641
-640 CGAAACTCCG TCTCAAAAAA AAAAGCAAAA GATACTACCA AGCCCTGCGG AGCAAGGTAC CTCACACTTC ATGAGCGAGT -561
-560 TAAGATGGGT TTCACAATTT TTCAAGCAAG GAAACGGGCT CGGAGGTCTT GAACACCTGC TACCCAATAG CAGAACAGCT -481
-480 ACTGGAAC TAATCCTCTG ATTTCAAATA ACAGCCCCGC CCACTACCAC TAAGTGAAGT CATCCACAAC CACACACCGA -401
-400 CCACTCTAAG CTTTTGTAAG ATCGGCTCGC TTTGGGGAAC AGGTCTTGTAG AGAACATCCC TTTTAAGGTC AGAACAAAGG -321
-320 TATTTTCATAG GTCCCAGGTC GTGTCCCGAG GCGCCACC CAAACATGAG CTGGAGCAAA AAGAAAGGGA TGGGGGACTT -241
-240 GGAGTAGGCA TAGGGGCGGC CCCTCCAAGC AGGGTGGCCT GGGACTCTTA AGGGTCAGCG AGAAGAGAAC ACACACTCCA -161
-160 GCTCCCGCTT TATTCGGTCA GATACTGACG GTTGGGATGC CTGACAAGGA ATTTCTTTTC GCCACACTGA GAAATACCCG -81
-80 CAGCGGCCCA CCCAGGCTG ACTTCCGGGT GGTGCGTGTG CTGCGTGTGC CGTCACGGCG TCACGTGGCC AGCGCGGGCT -1
1 TGTGGCGCGA GCTTTGAAA CTAGGCGCA GAGG
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80

```

B.

```

-80 | -70 | -60 | -50 | -40 | -30 | -20 | -10 |
-499 | | | | | | | CCGGTGGGT GCCCTCGTGG -481
-480 CGTTCTTGG AATGCGCCA TTCTGCCGGC TTGATATGG GGTGTGCGCG CGCCCCAGTC ACCCCTTCTC GTGGTCTCCC -401
-400 CAGGCTGCGT GCTGTGCCGG CCTTCTTAGT TGTCCTTAC TGCAGAGCCA CCTCCACCTC ACCCCCTAAA TCCCGGGGA -321
-320 CCCACTCGAG GCGGACGGG CCCCTGCAC CCCCTTCCC TGGCGGGGAG AAAGGCTGCA GCGGGGGAT TTGCATTTCT -241
-240 ATGAAAACCG GACTACAGGG GCAACTCCG CGCAGGGGAG GCGCGCGGCC TCAGGGATGG CTTTTGGGCT CTGCCCTTCG -161
-160 CTGCTCCCGG CGTTTGGCG CCGCGCCCC TCCCCTGGG CCGCGCCCCG CCCCTTCCC GCTCCATTC TCTGCCGGGC -81
-80 TTTGATCTTT GCTTAACAAC AGTAACGTCA CACGGACTAC AGGGGAGTTT TGTTGAAGTT GCAAAGTCCT GGAGCCTCCA -1
1 GA
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80

```

C.

```

-80 | -70 | -60 | -50 | -40 | -30 | -20 | -10 |
-934 | | | CAAT TGCGCCACT ATAAAACTG CCCCTCCGAG GCAAAGCTGT GAACCCCCGC -881
-880 GCCCTTTCCC CCAGGTGCC GAGGATGAA GTGGGTGCA ACGGAGACTC AGCTGAGCGT CCAGTTTCGG GCAATACAAA -801
-800 TCTCTCGGCT TCTACGAGCA GCCAGACGAC CCCGCGGACC GTGCTCCTG AACTTGACCG AGATGCAAAC TTCGGAGTGT -721
-720 TCTCAACGTG GGGGGCCGAC TCTCGGGAGA CCCCCCTAA ACTTAAGTCC CCTTAGGTC GCCCCACCT GGGACTTCAC -641
-640 AGAGCCACCT TAAGGGCGGT ATTCCC GCCGGAAGT GCGGGGGGT GGCAGCGTAC TTGGATTCTC AGCCTCCAGC -561
-560 CCGCGCGGT GCGCGCGCC GGTGGATGAC TTCGGGCC ACAAAGTGGG AAACAACAAC CACCCTCGC CCGCACCCCT -481
-480 GGCCCAAAAC AACTGGCCAG GTTCCCTGGC CTCCCGGGT CCTGCATCCC CCGCATCCCC GTCCCGAGCC GTGAACCTGA -401
-400 GCCCCCTCC ATCAGAGGTT GCGAGCGTCC GCCCGCTCGC GGCAGCCACC GTCCTAGAC AGTCAAACCC CAAGACGTCA -321
-320 GCCCAACAAT CACCGGGCG GCGGGGAAAA ACGGCCCGG GAGGGGACCG GGGAAGAGAG GGCCGAGAGG CGTGGCGCAG -241
-240 GGGGAGGGT AGGAGAAAGA AGGGCCGAC TGTAGGAGG CAGCGGAGCA TTACCTCATC CCGTGAGCCT CCGCGGGGCC -161
-160 AGAGAAGAAAT CTTCTAGGGT GGAGTCTCCA TGGTGA CCGG CCGGCCGCC CCCCTGAGAG CGACCGGAGC CAATGGGAAG -81
-80 GCCTTGGGGT GACATCATGG GCTATTTT GGGGTGACT GGTAGCAGAT AAGTGTGAG CTCGGGCTGG ATAAGGGCTC -1
1 AGAGTTGCAC TGAGTGTGGC TGAAGCAGCG AGGC
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80

```

Figura R31. Ejemplo de la presencia de tramos ricos en CG, incluyendo sitios de unión potenciales del factor Sp1, de tres de los promotores humanos analizados. (A): promotor de *BRC12*, (B): promotor de la *ciclina D1*, (C): promotor de *jun*. Los sitios de unión potenciales de Sp1 están indicados en azul. Los tramos CGNNCG aparecen en rojo. Las secuencias CGCCCC, CGGGCG y CGCGCG están subrayadas en rojo. El heptanucleótido CGGGGCG se indica mediante subrayado doble. Los nucleótidos que se solapan entre los diferentes tramos están marcados en verde.