

**TESI DOCTORAL**

**CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA DE CÈL·LULES  
TUMORALS A LES MITRAMICINES**

**Marc Bataller Chardi**  
**Barcelona, maig de 2009**



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Doctorat de Biomedicina

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Bienni 2004-2006

**CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA DE CÈL·LULES TUMORALS A  
LES MITRAMICINES**

Memòria presentada per

**Marc Bataller Chardi**

per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del Dr. José Portugal Minguela en el Institut de  
Biologia Molecular i Cel·lular de Barcelona (IBMB-CSIC)

El Director,

La Tutora,

José Portugal

Maria Soley

L'Autor,

Marc Bataller

Barcelona, maig de 2009



## *Agraïments*

*Doncs, per fi estic aquí, escrivint la part de la tesi que més gent llegirà. La part que més em costarà. La part més emotiva. La part que significa que la tesi s'ha acabat i una nova etapa s'obre davant meu, amb la incertesa del "què vindrà" i "què faré". No espereu trobar una llista d'anècdotes ni de moments estel·lars. Aquests agraïments són un recordatori de la gent que ha conviscut gairebé sis anys de la meua vida amb mi, fent el que més m'ha agradat i compartint amb ells moments irrepetibles. A tots, moltes gràcies.*

*Al Dr. José Portugal Minguela, Director de la Tesi Doctoral, voldria agrair-li l'oportunitat que m'ha donat per a poder realitzar aquesta Tesi amb la que he gaudit moltíssim. Voldria destacar la seguretat que dona tenir un Cap de projecte disposat a escoltar qualsevol idea que procedeixi dels seus becaris, discutir-la i posar-la en pràctica si escau. Aquesta forma de treballar afavoreix a la confiança i a la capacitat de creativitat, tan necessàries en persones que es volen dedicar a la investigació. Moltes gràcies pels bons moments, els quals han estat molts, i consells, els quals encara han estat més, que m'has aportat, així com la paciència i comprensió que m'has dedicat.*

*A la Dra. Maria Soley Farrés del Departament de Bioquímica i Biologia cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, per acceptar ser la meua tutora.*

*Al Dr. José A. Salas i al seu grup de recerca a la Universidad de Oviedo per subministrar-nos les Mitramicines.*

*A la Dra. Sylvia Mansilla, per ser sempre una ajuda impagable i una companya exemplar. Amb ella he après tot el que sé i m'ha solucionat tots els dubtes que m'han pogut sorgir. Impagables els moments a cultius, al citòmetre, barallant-nos amb els espectrofotòmetres i els lectors de plaques.*

*Al Dr. Ferran Azorín Marín i tots els seus col·laboradors per facilitar-me el treball en l'entorn del IBM-B-CSIC al Parc Científic de Barcelona. Aquesta Tesi Doctoral ha estat possible gràcies a una Beca del conveni entre el CSIC i el PCB.*

*A l'Esther i a la Bet, necessitaria una memòria tan llarga com aquesta per poder agrair-vos tot el que hem passat junts. Els bons moments són incomptables. Ho hem compartit tot, penes i alegries. L'amistat és un tresor incalculable i trobar-ne dues amigues com vosaltres és de les millors coses que m'han passat durant la tesi.*

*A la Marta Blanch, David, Ali, Sílvia, Noe, Xavi i Marta Batlle per fer tan amens els esmorzars i dinars, i per ser un grup genial. Per totes les sortides, dinars i calçotades. Sense vosaltres això hagués estat molt diferent.*

*A la resta del labo també tinc molt a agrair, perquè han contribuït en aquesta tesi, tant interessant-se pel meu treball com per solucionar-me qualsevol problema: Marta Rojas, Olga, Mónica, Xavi "Dorito", Lorena, Carles, Joan, Olivera, NINA, Sònia, Marta Lloret, Sergi, Martí, Naiara, Conchi, Elena, Rute, Gemma, Jordi Bernués, Marian i Lluïsa. També he de destacar a la gent que he tingut de pràctiques: M<sup>a</sup> José, Isra, Anna, Angela i Leire.*

*A la meua família, que sempre han estat al meu costat i m'han donat suport en tot el que he fet, independentment de si estaven o no d'acord. Sense ells això no hagués estat possible de cap de les maneres.*

*I finalment, a la Rosada, la persona que més feliç m'ha fet. Gràcies per ser com ets i per entendre com sóc.*

*Als meus pares*

*“La ciència té les arrels amargues, però dolços els fruits”*

*- Aristòtil-*

*“Si busques resultats diferents, no facis sempre el mateix”*

*-Albert Einstein-*



**ABC:** de l'anglès *ATP Binding Cassette*.

**APC:** de l'anglès *Anaphase-promoting complex*.

**BSA:** de l'anglès *Bovine Serum Albumin*.

**BrdU:** Bromur de desoxiuridina.

**Casp-3a:** Forma activa de la caspasa-3.

**CCCP:** Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona.

**Cdk:** de l'anglès *Cyclin-depenent kinase*.

**CFDASE:** Carboxifluoresceindiacetat succinimidil ester.

**CFSE:** Carboxifluorescein succinimidel ester.

**DD:** de l'anglès *Death domain*.

**DED:** de l'anglès *Death effector domain*.

**DiIC<sub>1</sub>(5):** iodur de 1,1',3,3,3',3'-hexametilindocarbocianina.

**DMSO:** Dimetil sulfòxid.

**DPCE:** Dietil pirocarbonat.

**EDTA:** de l'anglès *Ethylenediaminetetraacetic acid*.

**FBS:** de l'anglès *Fetal Bovine Serum*.

**FS:** de l'anglès *Forward Scatter*.

**H3pS10:** Histona 3 fosforilada a la serina 10.

**HEPES:** Àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazona-etanosulfònic.

**IP:** Iodur de propidi.

**LSC:** de l'anglès *Laser Scanning Cytometer*.

**MTT:** Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli.

**MDR:** de l'anglès *Multidrug Resistance*.

**MRP:** de l'anglès *Multidrug Resistance-associated Protein*.

**MSDK:** Mitramicina SDK.

**MSK:** Mitramicina SK.

**MTA:** Mitramicina A.

**PBS:** de l'anglès *Phosphate-buffered saline*.

**PMSF:** de l'anglès *Phenylmethanesulphonyl Fluoride*.

**Real-Time PCR:** de l'anglès *Real-Time Polymerase Chain Reaction*.

**RT-PCR:** de l'anglès *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*.

**SA- $\beta$ -gal:** de l'anglès *Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity*.

**S.D.:** Desviació estàndard de la mitjana.

**SEM:** de l'anglès *Standard Error of the Mean*.

**SS:** de l'anglès *Side Scatter*.

**TBE:** Tampó Tris-Borat-EDTA.

**TGF:** de l'anglès *Transforming Growth Factor*.

**X-Gal:** 5-Bromo-4-Cloro-3-Indole- $\beta$ -D-galactòsid.

**$\Delta\Psi_{mi}$ :** Potencial de membrana mitocondrial.

**ÍNDEX.**



<b>1. INTRODUCCIÓ.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. EL CICLE CEL·LULAR I EL SEU CONTROL.</b>	<b>3</b>
<b>1.2. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR.</b>	<b>5</b>
<b>1.3. RESPOSTES CEL·LULARS ENFRONT DE LA TERÀPIA     ANTITUMORAL.</b>	<b>11</b>
1.3.1. Apoptosi.	13
1.3.2. Catàstrofe mitòtica.	20
1.3.3. Senescència.	23
1.3.4. Necrosi.	26
<b>1.4. FÀRMACS ANTITUMORALS PRODUÏTS PER     ACTINOMICETS.</b>	<b>28</b>
1.4.1. Compostos produïts per Actinomicets.	29
1.4.2. Aïllament de gens involucrats en la biosíntesi d'agents antitumorals.	30
1.4.3. Generació de nous fàrmacs mitjançant manipulació genètica.	31
1.4.3.1. Inactivació de gens dianes.	31
1.4.3.2. Expressió gènica heteròloga.	31
1.4.3.3. Biosíntesi combinatorial.	31
1.4.4. Problemes de secreció i supervivència.	32
1.4.5. Fàrmacs del grup de l'àcid aureòlic.	32
1.4.5.1. Mitramicines.	34
<b>2. OBJECTIUS.</b>	<b>39</b>
<b>2.1. Objectius concrets.</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIALS I MÈTODES.</b>	<b>43</b>
<b>3.1. MITRAMICINES.</b>	<b>45</b>
3.1.1. Preparació i determinació de la concentració de les Mitramicines.	45
<b>3.2. LÍNIES CEL·LULARS I CONDICIONS DE CULTIU.</b>	<b>46</b>
3.2.1. Descripció de les línies cel·lulars.	46
3.2.2. Manteniment de les cèl·lules.	47
3.2.3. Tractament amb tripsina-EDTA.	47
3.2.4. Congelació i descongelació.	49

<b>3.3. ASSAIGS D'INHIBICIÓ DEL CREIXEMENT CEL·LULAR, TRACTAMENTS FARMACOLÒGICS I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES.</b>	<b>50</b>
3.3.1. Mètode del MTT	50
3.3.1.1. Determinació de les corbes de creixement.	51
3.3.1.2. Determinació de la citotoxicitat de les Mitramicines.	52
3.3.2. Tractaments farmacològics i obtenció de les mostres.	52
<b>3.4. ANÀLISI DELS EFECTES ANTITUMORALS DE LES MITRAMICINES: EFECTES CITOSTÀTICS I CITOTÒXICS.</b>	<b>53</b>
3.4.1. Assaigs per analitzar els efectes citostàtics dels antitumorals.	53
3.4.1.1. Tinció amb iodur de propidi.	53
3.4.1.2. Assaigs per a determinar la presència de senescència cel·lular.	55
3.4.1.2.1. Detecció de granularitat i augment de la mida cel·lular mitjançant citometria.	55
3.4.1.2.2. Tinció SA- $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0.	55
3.4.1.3 Assaig per determinar la divisió cel·lular: Tinció amb CFSE.	58
3.4.1.4. Determinació de la síntesi de DNA.	59
3.4.1.5. Anàlisi de l'índex mitòtic.	61
3.4.2. Assaigs per determinar els efectes citotòxics dels antitumorals.	63
3.4.2.1. Assaig de viabilitat: Blau de tripà.	63
3.4.2.2. Tinció doble amb iodur de propidi i Anexina-V-fluoresceïna.	64
3.4.2.3. Detecció de cèl·lules poliploides.	65
3.4.2.4. Detecció de mitosis aberrants.	66
3.4.2.5. Anàlisi de l'activació de les caspases 2 i 3.	68
3.4.2.6. Detecció per immunofluorescència de l'activació de la caspasa 3.	69
3.4.2.7. Anàlisi dels canvis de potencial de membrana mitocondrial.	70
3.4.2.8. Assaig clonogènic.	72

<b>3.5 ANÀLISIS DE L'EFECTE DE LA MITRAMICINA SK SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN CÈL·LULES HCT116.</b>	<b>73</b>
3.5.1 Preparació de les cèl·lules i extracció d'RNA a partir del cultiu cel·lular.	73
3.5.2. Determinació de la puresa i quantificació de la concentració d'RNA.	75
3.5.3. Tractament amb DNasa I.	75
3.5.4. Anàlisi de transcrits per RT-PCR semiquantitativa.	77
3.5.4.1. Preparació de les mostres d'RNA.	77
3.5.4.2. Amplificació dels transcrits mitjançant RT-PCR.	78
3.5.4.3. Electroforesi en gel d'agarosa.	78
3.5.5. Anàlisi dels transcrits per PCR quantitativa en Temps Real ( <i>Real-Time PCR</i> ).	80
3.5.5.1. Reacció de transcripció reversa.	81
3.5.5.2. Amplificació de l'amplicó.	81
3.5.6. Encebadors per les PCRs.	82
3.5.6.1. Encebadors utilitzats.	83
<b>3.6. ANÀLISI DE L'EFECTE DE LA MITRAMICINA SK SOBRE ELS NIVELLS DE PROTEÏNES MITJANÇANT WESTERN-BLOT.</b>	<b>84</b>
3.6.1. Preparació de les cèl·lules i extracció de proteïna a partir del cultiu cel·lular.	84
3.6.2. Determinació de la concentració de proteïna total.	85
3.6.3. Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida.	86
3.6.4. Transferència de les proteïnes.	88
3.6.5. Immunodetecció.	90
3.6.6. Quantificació dels <i>Western-blots</i> .	92
<b>4. RESULTATS.</b>	<b>93</b>
<b>4.1. DETERMINACIÓ DE LA DENSITAT INICIAL DEL INÒCUL.</b>	<b>95</b>
<b>4.2. DETERMINACIÓ DE LA CAPACITAT DE LES MITRAMICINES D'INHIBIR LA PROLIFERACIÓ EN LES LÍNIES CEL·LULARS HCT116.</b>	<b>96</b>
<b>4.3. QUANTIFICACIÓ DELS EFECTES CITOTÒXICS I CITOSTÀTICS DE LA MITRAMICINA SK EN LES LÍNIES CEL·LULARS HCT116.</b>	<b>99</b>

4.3.1. Anàlisi de la viabilitat cel·lular després del tractament amb Mitramicina SK.	100
4.3.2. Anàlisi de les pertorbacions del cicle cel·lular induïdes per la Mitramicina SK.	102
4.3.3. Anàlisi de la proliferació cel·lular induïda per la Mitramicina SK.	104
<b>4.4. ANÀLISI DE LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR INDUÏDA PER MITRAMICINA SK.</b>	<b>105</b>
<b>4.5. ANÀLISI DE LA SÍNTESI DE DNA EN CÈL·LULES HCT116 TRACTADES AMB MITRAMICINA SK.</b>	<b>108</b>
<b>4.6. ANÀLISI DE LA FRACCIÓ MITÒTICA EN CÈL·LULES HCT116 TRACTADES AMB MITRAMICINA SK.</b>	<b>110</b>
<b>4.7. ANÀLISI MORFOLÒGICA DE LA POBLACIÓ POLIPLOIDE.</b>	<b>114</b>
4.7.1. Anàlisi de la morfologia mitjançant LSC.	114
4.7.2. Anàlisi de la morfologia mitjançant microscòpia de fluorescència.	115
<b>4.8. ANÀLISI DE LA MORT CEL·LULAR PER APOPTOSI O NECROSI.</b>	<b>121</b>
<b>4.9. ANÀLISI DE L'ACTIVACIÓ DE LES CASPASES 2 I 3.</b>	<b>124</b>
<b>4.10. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE GENS INVOLUCRATS EN LA REGULACIÓ DEL CICLE I LA MORT CEL·LULAR EN LES CÈL·LULES HCT116 TRACTADES AMB MSK.</b>	<b>131</b>
4.10.1. Anàlisi dels nivells de transcripció en cèl·lules HCT116 p53+/+ per <i>Real-Time PCR</i> .	132
4.10.2. Anàlisi dels nivells de transcripció en cèl·lules HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/- per RT-PCR semiquantitativa.	134
4.10.3. Anàlisis dels nivells de proteïnes per <i>Western blot</i> .	136
<b>4.11. ANÀLISI DE LA CAPACITAT DE PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES POLIPLOIDES.</b>	<b>140</b>
<b>5. DISCUSSIÓ.</b>	<b>143</b>
<b>6. CONCLUSIONS.</b>	<b>161</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>165</b>
<b>8. ANNEX.</b>	<b>183</b>

## **ÍNDIX DE FIGURES I TAULES**

<b>Figura I1.</b> Esquema de les quatre fases del cicle cel·lular i de la mitosis.	<b>4</b>
<b>Figura I2.</b> Regulació del cicle cel·lular pels complexos cdk/ciclins.	<b>6</b>
<b>Figura I3.</b> Punt de control de la fase G1/S.	<b>7</b>
<b>Figura I4.</b> Punt de control de la fase G2/M.	<b>8</b>
<b>Figura I5.</b> Percentatge d'alteracions del gen <i>p53</i> en diferents càncers humans.	<b>12</b>
<b>Figura I6.</b> Via extrínseca de l'apoptosi.	<b>16</b>
<b>Figura I7.</b> Via intrínseca de l'apoptosi.	<b>17</b>
<b>Figura I8.</b> Diferents mètodes per la detecció de l'apoptosi.	<b>20</b>
<b>Figura I9.</b> Diferents mètodes per la detecció de la catàstrofe mitòtica.	<b>23</b>
<b>Figura I10.</b> Diferents mètodes per la detecció de la senescència.	<b>25</b>
<b>Figura I11.</b> Diferents mètodes per la detecció de la necrosi.	<b>27</b>
<b>Figura I12.</b> Estructures dels compostos naturals del grup de l'àcid aureòlic.	<b>33</b>
<b>Figura I13.</b> Biosíntesi de la MTA.	<b>34</b>
<b>Figura I14.</b> Estructura tridimensional d'un dímer de MTA unit al DNA.	<b>35</b>
<b>Figura I15.</b> Biosíntesi de la MSK i MSDK, anàlegs de la MTA.	<b>37</b>

<b>Figura M1.</b> Esquema on es mostra com es detecta la dispersió directa i la dispersió lateral en un citometre de flux.	<b>55</b>
<b>Figura M2.</b> La tinció amb CFSE permet seguir la divisió cel·lular mitjançant citometria de flux.	<b>58</b>
<b>Figura M3.</b> Components del sistema de electroforesi Miniprotean (Bio-Rad).	<b>87</b>
<b>Figura M4.</b> Muntatge de la transferència en un experiment de Western-blot.	<b>89</b>
<b>Figura R1.</b> Determinació del nombre de cèl·lules de la línia HCT116 p53+/+ calculada mitjançant l'assaig colorimètric del MTT.	<b>96</b>
<b>Figura R2.</b> Citotoxicitat de Mitramicina A (MTA) i Mitramicina SK (MSK)	<b>97</b>
<b>Figura R3.</b> Concentració de cèl·lules (cèl/ml) al llarg de 144 h de tractament amb MSK	<b>100</b>
<b>Figura R4.</b> Alteracions en la distribució del cicle cel·lular.	<b>102</b>
<b>Figura R5.</b> Tinció amb CFSE.	<b>104</b>
<b>Figura R6.</b> Determinació de l'activitat SA- $\beta$ -gal lisosomal a pH 6.0.	<b>106</b>
<b>Figura R7.</b> Determinació de la mida i granularitat de les cèl·lules HCT116 p53+/+.	<b>107</b>
<b>Figura R8.</b> Determinació de la capacitat de les cèl·lules de sintetitzar DNA mitjançant la incorporació de BrdU.	<b>110</b>
<b>Figura R9.</b> Determinació de l'índex mitòtic en cèl·lules HCT116 p53+/+.	<b>111</b>
<b>Figura R10.</b> Determinació de l'índex mitòtic en cèl·lules HCT116 p53-/-.	<b>112</b>
<b>Figura R11.</b> Determinació de l'índex mitòtic en cèl·lules HCT116 p21-/-.	<b>113</b>

- Figura R12.** Anàlisi de LSC de les cèl·lules HCT116 p53+/+. **115**
- Figura R13.** Tinció amb DAPI i immunodetecció de la  $\beta$ -tubulina en cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 72 hores + 24 hores. **116**
- Figura R14.** Tinció amb DAPI i immunodetecció de la  $\beta$ -tubulina en cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 72 hores + 48 hores. **117**
- Figura R15.** Tinció amb DAPI i immunodetecció de la  $\beta$ -tubulina en cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 72 hores + 72 hores. **118**
- Figura R16.** Tinció amb DAPI i immunodetecció de la  $\beta$ -tubulina en cèl·lules HCT116 p53-/- tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 72 hores. **119**
- Figura R17.** Tinció amb DAPI i immunodetecció de la  $\beta$ -tubulina en cèl·lules HCT116 p21-/- tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 72 hores. **120**
- Figura R18.** Doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi de cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK. **122**
- Figura R19.** Doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi de cèl·lules HCT116 p53-/- tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK. **123**
- Figura R20.** Doble tinció amb Anexina-V-Fluos i iodur de propidi de cèl·lules HCT116 p21-/- tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK. **124**
- Figura R21.** Determinació de l'activació de la caspasa 3 durant el procés de mort cel·lular induïda per MSK. **125**
- Figura R22.** Anàlisi dels canvis en els nivells de la forma activa de la caspasa 3 en les tres línies cel·lulars tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK mitjançant *Western blot*. **126**

- Figura R23.** Tinció amb DAPI i immunodetecció de la Casp-3a en cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 72 hores + 72 hores. **127**
- Figura R24.** Tinció amb DAPI i immunodetecció de la Casp-3a en cèl·lules HCT116 p53-/- i p21-/- tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 72 hores. **128**
- Figura R25.** Determinació de l'activació de la caspasa 2 durant el procés de mort cel·lular per apoptosi induïda per la MSK a les 72 hores de tractament en les línies cel·lulars HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/- . **129**
- Figura R26.** Determinació dels canvis del potencial de membrana mitocondrial durant el procés de mort cel·lular per apoptosi o catàstrofe mitòtica induïts per MSK. **131**
- Figura R27.** Canvis en la transcripció de varis gens involucrats en el control del cicle cel·lular induïts per la MSK en les cèl·lules HCT116 p53+/+ . **133**
- Figura R28.** RT-PCR semiquantitativa per a determinar els canvis en la expressió dels gens *cycA*, *p21<sup>WAF1</sup>*, *p53* i *c-myc* en les cèl·lules HCT116 p53-/- i les cèl·lules HCT116 p21-/- tractades amb la IC<sub>75</sub> de MSK durant 4 hores i 24 hores. **134**
- Figura R29.** Anàlisi dels canvis en els nivells de les proteïnes Ciclina B1, p53, p21<sup>WAF1</sup> i c-myc en cèl·lules HCT116 p53+/+ amb la IC<sub>75</sub> de MSK. **136**
- Figura R30.** Anàlisi en cèl·lules HCT116 p53-/- amb la IC<sub>75</sub> de MSK a les 72 hores de tractament i 24 hores després del canvi de medi de cultiu dels canvis en els nivells de les proteïnes Ciclina B1, p53, p21<sup>WAF1</sup> i c-myc mitjançant *Western blot*. **137**
- Figura R31.** Anàlisi en cèl·lules HCT116 p21-/- amb la IC<sub>75</sub> de MSK des de les 24 hores fins a les 72 hores de tractament dels canvis en els nivells de les proteïnes Ciclina B1, p53, p21<sup>WAF1</sup> i c-myc mitjançant *Western blot*. **138**
- Figura R32.** Quantificació dels *Western blots*. **139**

<b>Figura R33.</b> Anàlisi del cicle cel·lular de les cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades amb la IC <sub>75</sub> de MSK durant 72 hores + 72 hores.	<b>141</b>
<b>Figura R34.</b> Assaig clonogènic de cèl·lules HCT116 p53+/+ tractades prèviament amb la IC <sub>75</sub> de MSK durant 72 hores + 72 hores.	<b>142</b>
<b>Figura D1.</b> Model que il·lustra la resposta cel·lular de les cèl·lules HCT116 p53+/+ en front al tractament amb MSK.	<b>154</b>
<b>Figura D2.</b> Model que il·lustra la resposta cel·lular de les cèl·lules HCT116 p53-/- en front al tractament amb MSK.	<b>155</b>
<b>Figura D3.</b> Model que il·lustra la resposta cel·lular de les cèl·lules HCT116 p21-/- en front al tractament amb MSK.	<b>156</b>
<b>Figura D4.</b> Mida representativa de tumors de pàncrees humans <i>xenotrasplantats</i> en ratolins.	<b>158</b>
<b>Taula I1.</b> Respostes antiproliferatives i de mort cel·lular observades en teràpia antitumoral.	<b>13</b>
<b>Taula I2.</b> Classificació de les caspases segons la seva funció.	<b>15</b>
<b>Taula I3.</b> Fàrmacs antitumorals produïts per Actinomicets amb aplicació clínica en tractaments quimioterapèutics.	<b>29</b>
<b>Taula M1.</b> Patró de tinció de les cèl·lules viables, apoptòtiques i necròtiques amb iodur de propidi i Anexina-V-Fluos.	<b>65</b>
<b>Taula M2.</b> Encebadors utilitzats en RT-PCR semiquantitativa.	<b>83</b>
<b>Taula M3.</b> Encebadors utilitzats en <i>Real-Time PCR</i> .	<b>83</b>
<b>Taula M4.</b> Anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi.	<b>91</b>

**Taula R1.** Valors de les concentracions de Mitramicina A i Mitramicina SK que inhibeixen el creixement cel·lular un 50% (dosis IC<sub>50</sub>) o un 75% (dosis IC<sub>75</sub>) en les línies HCT116 p53+/+, HCT116 p53-/- i HCT116 p21-/-. **98**

**Taula R2.** Recompte de la viabilitat cel·lular (%) de les tres línies cel·lulars tractades amb la dosis IC<sub>75</sub> de la Mitramicina SK durant 72 hores amb el posterior canvi de medi de cultiu. **101**

**Taula D1.** Taula comparativa de la resposta cel·lular al tractament amb la corresponent IC<sub>75</sub> de Mitramicina SK de les diferents línies de cèl·lules HCT116 analitzades. **149**