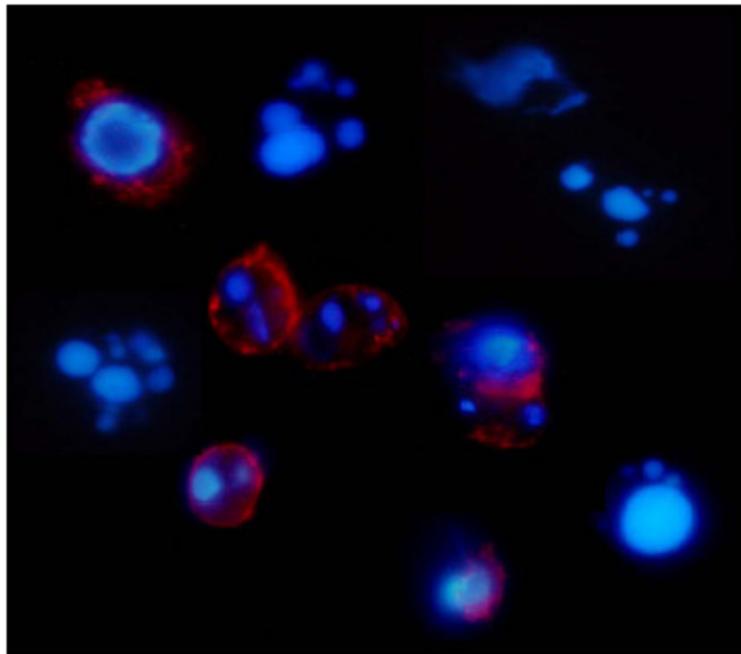


Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides



Silvia Marcé Torra

**Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona**

**BASES MOLECULARES DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DROGAS EN
NEOPLASIAS LINFOIDES**

Tesis doctoral presentada por Silvia Marcé Torra para optar al
grado de doctora en Biología.

A tu, pare.
Sempre vas estar allà,
malgrat no entendre
massa el què feia.
Gràcies per donar-me la
mà i ensenyar-me a
caminar per la vida.
Siguis on siguis, el meu
record i aquesta tesi són
per tu.

Silvia

"... la ciencia está hecha
de errores, pero estos
errores son pasos que nos
llevan hacia la verdad."

Julio Verne

Agradecimientos

"Si el vent et ve en contra quan els temps siguin durs, que sempre hi hagi una mà on et puguis agafar, que no et faltin mai companys amb qui poder conversar.... Que la nit és un viatge llarg però s'ha de poder arribar."

Viatge llarg (Sau)

Antes que a nadie, gracias a ti Dolors por haberme enseñado todo lo que sé, por tener la paciencia de guiarme por este camino de la ciencia y la investigación y enseñarme a no perder la esperanza ante los fracasos y a ilusionarme con cada logro. Gracias por la confianza que, junto con Neus, pusisteis en mí.

Neus, gracias por todas las horas que pasaste a mi lado frente el citómetro y los ordenadores, por cada palabra de ánimo que me ayudaba a seguir adelante y gracias, también, por las carcajadas y silbidos que llenaban el laboratorio a últimas horas de la tarde.

Al profesor Montserrat por haberme dado la oportunidad de integrarme en su equipo y haberme enseñado a conocer el mundo de la hematología.

A Elias Campo, de quién he aprendido a buscar el porqué de todas las cosas y a entusiasmarme con cada caso y resultado. Gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia con cada palabra y cada gesto.

Mis pequeñas, Ester y Silvia, en estos últimos años os habéis convertido en una vía de escape dentro y fuera del laboratorio. Cuántas veces me habéis aguantado y hecho reír!!! No sé expresar en palabras lo que os agradezco que estuvierais a mi lado y lo mucho que os quiero. Pero, a veces, las palabras sobran.

A mis post-doc y mi pre-doc favoritos, Patricia, Gaël y Mónica. Muchas gracias por todo lo que he aprendido de vosotros y, espero, por lo que me seguiréis enseñando. Gracias por las risas, las bromas, las prisas y despistes que han dado vida a nuestro pequeño habitáculo que se ha convertido, prácticamente, en nuestro hogar.

A ti Bea, qué decirte que no sepas ya! Gracias por todo, gracias por la paciencia que tuviste en mis comienzos y por enseñarme tanto, por las veces que discutíamos un experimento o unos resultados y con ello aprendía un poco más. Gracias por enseñarme a aprender cada detalle. Tal vez fue difícil al principio, pero también eso me enseñó a seguir adelante.

Y ya que hablo de Bea, también gracias a su equipo técnico: a Mari y a Raquel, habéis sido unas amigas inolvidables todo este tiempo. Raquel, cómo olvidar las tardes que, aunque sin decirnos nada, pasábamos juntas en el laboratorio. Tú Mari fuiste la primera en irte pero seguiste aquí cada momento que necesité de ti. A las dos, gracias.

Ana y Marta, gracias por ser mis compañeras de fatigas. Contigo Ana compartimos tantas horas pasando tubos por el citómetro y comentando resultados que incluso creo que esta tesis es un poco parte de ti. Y tú Marta, llegaste al laboratorio en mi peor momento y supiste "echarme el cable" que necesitaba entre ZAP y PCR.

También a ti Mireya, gracias por las horas de charla, por todos los consejos y enseñanza clínica, por los momentos en los que nos hemos animado la una a la otra y en los que nos hemos reído tanto. Y como no, también a Jordi Esteve, Armado López-Guillermo y Francesc Bosch, que siempre habéis tenido una palabra agradable para mí y habéis participado en mis trabajos.

Contigo Carol, hemos compartido congresos y esfuerzo en nuestro trabajo y las dos sabemos lo que es pasar horas frente al ordenador. Gracias por las palabras de ánimo y el apoyo moral.

A mis "mamis" del Clínic, Rosa, Montse Ràfols i Montse Fàbregues, que me habéis cuidado y me habéis aconsejado sobre las cosas de la vida. Después de pasar tantas horas en el laboratorio, siempre me quedaba la certeza de que aquí estaría como en casa.

A Marta Aymerich, que has sufrido nuestros alborotos día tras día, gracias por la paciencia que has tenido y las veces que también me has enseñado y animado. Cómo olvidar esos días de agosto compartiendo en silencio el laboratorio! Y también a Josep Lluís, gracias por las horas frente al microscopio en las que he aprendido tanto y todas esas anécdotas de los viejos tiempos. A ambos deciros que nunca podré olvidar toda la ayuda que me prestasteis en uno de los peores momentos. Gracias de corazón!

Maruja, agradecerte todas las sesiones que has preparado con total dedicación y que me han ido formando a lo largo de estos años.

A Elena y Isabel, las vecinas de molecular 1. Os acordáis de esas charlas mientras calibraba algún pH? Hemos compartido momentos que, sin duda, han resultado muy agradables.

Y vosotras, Sandra Martínez, Carolina Sebastià y Sandra Cabezas, que de forma discreta también animábais las mañanas y las tardes del laboratorio. Y también fuera, en todas esas cenas y risas que hemos compartido. Gracias, chicas, por tener siempre una sonrisa.

A ti Nerea, que estuviste en mis comienzos y has vuelto en la última etapa. Gracias por toda la ayuda que me has prestado en estas dos fases de mi trabajo.

Y no me olvido de nuestra secretaria! Silvia, cuántas veces me debes haber dicho cómo se pedía el material. Y es que, en el fondo, esto no funcionaría sin ti!

A Jaume Caral, que me llevaste de la mano por los laberintos del Clínic y me enseñaste a buscar la información que necesitaba hasta llegar donde estoy ahora. Gracias por tu tiempo y por creer que valía la pena echarme una mano.

Gracias también a Marisa y a Núria por la paciencia que han tenido cada vez que he necesitado su ayuda y por todos los consejos para facilitarnos el manejo y organización de muestras.

A los becarios y técnicos de Elias, Silvia, Lluís, Magda, Fredi, Iti, Nica e Ira, y por las horas de seminarios y experimentos compartidos y sus buenos consejos. A Olga Balagué por su compañerismo, participación y apoyo en el último artículo de esta tesis.

A mis compañeras de la Facultad de Biología, Míriam e Isabel, gracias por adentrarme en el mundo de los transportadores y por sufrir conmigo las esperas y compartir las alegrías. A Marçal, porque sin sus conocimientos, el segundo y tercer trabajos de esta tesis tal vez no habrían sido posibles.

A la gente de Bellvitge, Clara, Montse, Dani y Santi, con los que he compartido muy buenos momentos en las distintas aporeuniones.

Mis compañeras de estudio, Sylvia, Loli, Silvia y Marta, a las que no sólo os agradezco el haber compartido cinco años de carrera con sus altibajos sino también, el día a día de esta tesis y de nuestras vidas.

Y a mis amigos de toda la vida, Montse, Ana, Marta y Gerard, que habéis sido un punto de apoyo, y lo seguiréis siendo, a lo largo de mi trabajo y de mi vida. Cuántos momentos en los que he necesitado vuestro consejo y otros en los que os daba yo el mío... pero siempre para acabar enfrentándonos a todo con la mejor de nuestras sonrisas. Por todos estos momentos que hemos pasado y por los que espero seguir pasando a vuestro lado, gracias!

A mi niño. Javi, gracias en especial a ti por aguantar mi malhumor con paciencia, por no tener en cuenta mis enfados y aceptarme y, sobretodo, entenderme tal como soy, por dejarme llorar cuando lo he necesitado y reír conmigo en los momentos más felices, por aguantar este último año, tal vez el peor, y darme el apoyo incondicional en cada momento. Gracias por quererme!

Y por encima de todo, gracias a mi familia. A las pequeñas Paula y Judit, que habéis sido la alegría de casa desde el día que nacisteis y habéis llenado nuestras vidas con vuestras risas. A mis hermanos, Elisabet, Armand y Eva, que me habéis apoyado en cada momento y me habéis animado desde el primer día. A mi padre, que estuvo a mi lado en los principios de esta tesis y, de algún modo, lo sigue estando en mi corazón ahora que llego al final. Y a la mejor de todos, a mi madre, que con tu forma de ser me has enseñado a luchar y a no perder nunca la confianza en mí misma. A ti te debo todo lo que soy y lo que he conseguido. Muchas gracias familia!!!

A todos vosotros y a aquellos que, probablemente, he olvidado por el camino, gracias por haber seguido este recorrido conmigo!!!

Introducción	5
1.- Apoptosis	7
1.1.- Definición	7
1.2.- Introducción histórica	8
1.3.- Características morfológicas y bioquímicas	9
1.4.- Etapas y vías de la muerte celular por apoptosis	9
1.5.- La maquinaria apoptótica	9
1.5.1.- Las caspasas	9
1.5.2.- Sustratos de las caspasas	12
1.5.3.- Inhibidores de las caspasas	13
1.5.4.- Proteínas de la superfamilia de Bcl-2	15
1.6.- Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca	19
1.7.- Implicación de la mitocondria en el proceso de apoptosis	20
1.7.1.- Citocromo c	22
1.7.2.- Liberación de AIF: muerte independiente de caspasas	22
1.7.3.- Smac/Diablo	23
1.8.- Otras vías de activación de caspasas y apoptosis	23
1.9.- Transducción de señales en la regulación de la apoptosis	23
1.9.1.- Vías de supervivencia	24
2.- Apoptosis y cáncer	28
3.- La leucemia linfática crónica de tipo B (LLC-B)	29
3.1.- Definición y epidemiología	29
3.2.- Diagnóstico, síntomas y signos	30
3.3.- Pronóstico	32
3.4.- Biología de la LLC-B	33
3.5.- Citogenética y alteraciones oncogénicas	34
3.6.- Regulación de la apoptosis	36
3.6.1.- Miembros de la familia de Bcl-2 y IAP's en la LLC-B	37
3.6.2.- Vía de NF- κ B	38
3.6.3.- Vía de p53/ATM	39
4.- El linfoma de las células del manto (LCM)	39
4.1.- Definición	39
4.2.- Características inmunofenotípicas	40
4.3.- Variantes y pronóstico	40
4.4.- Alteraciones genómicas	41

4.4.1.- Translocación t(11;14)(q13;q32)	41
4.4.2.- Alteraciones en otras proteínas implicadas en ciclo celular	43
4.4.3.- Deleción de 11q y ATM	44
4.4.4.- Otras alteraciones genómicas	45
5.- Agentes quimioterápicos y mecanismos de acción	47
5.1.- Análogos de purinas	47
5.2.- Agentes alquilantes	48
5.3.- Inhibidores de la topoisomerasa II	48
5.4.- Anticuerpos monoclonales	48
5.5.- Inhibidores de la vía de síntesis de ácidos nucleicos	50
5.6.- Problemas de la terapia actual	51
5.7.- Desarrollo de nuevas terapias	52
6.- Implicación de los transportadores de nucleósidos en la resistencia a fármacos	54
6.1.- Mecanismos de resistencia	54
6.2.- Transportadores de nucleósidos	54
6.2.1.- Transportadores equilibrativos (ENT)	55
6.2.1.1.- Propiedades cinéticas	55
6.2.1.2.- Características moleculares y estructurales	56
6.2.2.- Transportadores concentrativos (CNT)	57
6.2.2.1.- Propiedades cinéticas	57
6.2.2.2.- Características moleculares y estructurales	57
6.2.2.3.- CNT3	58
6.3.- Implicación del transporte en la resistencia	59
Objetivos	63
Materiales y métodos	67
1.- Líneas y cultivos celulares	69
2.- Determinación de la viabilidad celular	69
3.- Detección de micoplasma en los cultivos celulares	69
4.- Obtención de células mononucleares	70
5.- Descongelación y cultivo de células primarias	70
6.- Análisis de proteínas	70
6.1.- Estudio de proteínas intracelulares por citometría de flujo	70
6.2.- Obtención de extractos proteicos totales	70
6.3.- Fraccionamiento subcelular: obtención de las fracciones	

citosólica, mitocondrial y de membrana	71
6.4.- Valoración de proteínas y electroforesis en geles de acrilamida	72
6.5.- Análisis de proteínas por Western Blot	72
7.- Anticuerpos para inmunotransferencia y citometría de flujo	73
8.- Determinación de la viabilidad celular tras tratamiento	74
8.1.- Marcaje por Anexina V/PI	74
8.2.- Detección de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometría de flujo	74
8.3.- Ensayos MTT	74
9.- Detección de la producción de ROS	75
10.- Determinación del transporte de nucleósidos	75
11.- PCR cuantitativa	75
11.1.- Determinación de los niveles de expresión de mRNA de los transportadores de nucleósidos	75
11.2.- Análisis de la presencia de deleciones de p16 y MTAP	76
12.- Inmunohistoquímica	76
13.- Determinación de los niveles de ATP	77
14.- Inmunolocalización de proteínas intracelulares	77
Artículos	79
Resultados y Discusión	165
Conclusiones	185
Bibliografía	189
Anexo	221