

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE NUEVAS
HERRAMIENTAS
BIOTECNOLÓGICAS PARA LA
MANIPULACIÓN DE LA
QUIMIORRESISTENCIA Y COMO
BIOSENSORES DE AGENTES
GENOTÓXICOS**

LAURA SÁNCHEZ VICENTE

2014



**UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**DESARROLLO DE NUEVAS HERRAMIENTAS
BIOTECNOLÓGICAS PARA LA MANIPULACIÓN
DE LA QUIMIORRESISTENCIA Y COMO
BIOSENSORES DE AGENTES GENOTÓXICOS**

Memoria que presenta **Dña. Laura Sánchez Vicente** para optar al
Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 29 de Abril de 2014

D^a. M^a JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas para la manipulación de la quimiorresistencia y como biosensores de agentes genotóxicos" presentada por Dña. Laura Sánchez Vicente para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. D. José Juan García Marín, D. Óscar Briz Sánchez y Dña. Elisa Herráez Aguilar del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 29 de abril de dos mil catorce.



Fdo. M^a Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA, D. ÓSCAR BRIZ SÁNCHEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA, Y DÑA. ELISA HERRÁEZ AGUILAR, PROFESORA AYUDANTE DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "DESARROLLO DE NUEVAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA MANIPULACIÓN DE LA QUIMIORRESISTENCIA Y COMO BIOSENSORES DE AGENTES GENOTÓXICOS" presentada por D^a. Laura Sánchez Vicente para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 29 de abril de dos mil catorce.



Fdo. José Juan García Marín



Fdo. Óscar Briz Sánchez



Fdo. Elisa Herráez Aguilar

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato de Investigación para la formación de personal de reciente titulación, de la Junta de Castilla y León/ Fondo Social Europeo.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto GR75/2008. "Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo". Investigador Principal: JJ García Marín. Periodo: 2008-2010.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto SAF2010-15517. "Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas". Investigador Principal: JJ García Marín. Periodo: 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA023A11-2. "Evaluación de estrategias de supresión tumoral por inducción de diferenciación celular mediante la activación de la vía de señalización regida por el gen NR1H4". Investigador Principal: MJ Monte Río. Periodo: 2011-2013.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO/03/SA23/11. "Bases moleculares de la respuesta SOS mediada por el receptor nuclear FXR y su papel en la hepatocarcinogénesis". Investigador Principal: JJ García Marín. Periodo: 2011-2012.

Fundación "Samuel Solórzano Barruso", Universidad de Salamanca. Proyecto FS/1-2011. "Papel de las variantes del gen *SLC22A1* que codifica el transportador de cationes orgánicos OCT1 en la variabilidad interindividual relativa a la sensibilidad de tumores hepáticos e intestinales a la quimioterapia antitumoral". Investigador Principal: Óscar Briz Sánchez. Periodo: 2012.

Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Proyecto PII1/00337. "Efecto de analgésicos y antiinflamatorios prescribibles durante el embarazo sobre la expresión/función de la proteína de resistencia a la quimioterapia en el cáncer de mama (BCRP) en la barrera placentaria". Investigador Principal: MJ Pérez García. Periodo: 2012-2014.

Fundación "Samuel Solórzano Barruso", Universidad de Salamanca. Proyecto FS7-2013. "Relación entre la respuesta al tratamiento con sorafenib en paciente con cáncer hepático y los cambios de expresión y aparición de variantes aberrantes del Gen SLC22A1". Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2014.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto S015U13. "Papel de las mutaciones de la proteína de captación de fármacos OCT1 en la refractariedad del carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma al tratamiento con sorafenib". Investigador Principal: JJ García Marín. Periodo: 2014-2016.

Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía. Programa: Proyectos de Excelencia. Proyecto AGR587. "Estrategias seguras, basadas en recursos andaluces, para la alimentación del caprino. Mejora de la calidad y funcionalidad de productos lácteos y reducción del impacto ambiental de la producción ganadera". Investigador Principal: E. Molina Alcaide. Periodo: 2014-2018.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Elisa Lozano, **Laura Sanchez-Vicente**, Maria J. Monte, Elisa Herrauez, Oscar Briz, Jesus M. Banales, Jose J.G. Marín, Rocio I.R. Macias. Cocarcinogenic Effects of Intrahepatic Bile Acid Accumulation in Cholangiocarcinoma Development. *Molecular Cancer Research*, 12(1); 91-100.

En forma de abstract en las siguientes revistas:

O. Briz Sánchez, E. Herráez Aguilar, **L. Sánchez Vicente**, A. García Blázquez y J.J.García Marín. "Terapia génica para superar la resistencia del hepatocarcinoma a la quimioterapia antitumoral basada en la vectorización de fármacos y el aumento de expresión del transportador OATP1B1". *Gastroenterología y Hepatología* 2012, Vol. 35, pag. 151-152

O. Briz, E. Herráez, **L. Sanchez-Vicente**, J. Vaquero, E. Lozano, S. Jimenez, B. Castaño, J.J.G. Marin. "Strategy to overcome chemoresistance in hepatocellular tumours by enhancing the expression of the drug transporter OATP1B1". *Journal of Hepatology* 2012, Vol. 56, pag. S125

L. S. Vicente, O. B. Sánchez, E. H. Aguilar, M.A. S. Garcia, M. R. Romero and J. J. G. Marín. "Enhancing the expression of the drug transporter OATP1B1 as a potential strategy to overcome chemoresistance in liver tumours". *FEBS Journal* 2012, Vol. 279, pag. 257

Han sido presentados en los siguientes congresos:

Congreso: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona, 2011. Autores: **Laura Sánchez Vicente**, Elisa Herráez Aguilar, Óscar Briz Sánchez, Alba María García Blázquez, Eduarda Molina Alcaide y José Juan García Marín. Título: "Desarrollo de un test para la detección de contaminantes genotóxicos en alimentación humana y animal". Tipo de Comunicación: Oral

Congreso: XXXVI Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 2011. Autores: O. Briz, E. Herráez, E. González-Sánchez, M.R. Romero, J. Vaquero, M.J. Pérez, **L. Sánchez-Vicente**, M.J. Monte, J. Muntané, M.A. Serrano y J.J.G. Marín. Título: "Activación de FXR de forma independiente de ácidos

biliares: papel de la quimiorresistencia asociada a la expresión de MRP2". Tipo de Comunicación: Póster

Congreso: XXXVII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 2012. Autores: O. Briz Sánchez, E. Herráez Aguilar, **L. Sánchez Vicente**, A. García Blázquez y J.J.García Marín. Título: "Terapia génica para superar la resistencia del hepatocarcinoma a la quimioterapia antitumoral basada en la vectorización de fármacos y el aumento de expresión del transportador OATP1B1". Tipo de comunicación: Póster.

Congreso: 47th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Barcelona, 2012. Autores: O. Briz, E. Herráez, **L. Sanchez-Vicente**, J. Vaquero, E. Lozano, S. Jimenez, B. Castaño, J.J.G. Marin. Título: "Strategy to overcome chemoresistance in hepatocellular tumours by enhancing the expression of the drug transporter OATP1B1". Tipo de comunicación: Póster.

Congreso: 22nd IUBMB and 37th FEBS Congress. Sevilla, 2012. Autores: **L. S. Vicente**, O. B. Sánchez, E. H. Aguilar, M.A. S. Garcia, M. R. Romero and J. J. G. Marín. Título: "Enhancing the expression of the drug transporter OATP1B1 as a potential strategy to overcome chemoresistance in liver tumours". Tipo de comunicación: Póster.

Congreso: Falk Symposium 184. XXII International Bile Acid Meeting. Viena, 2012. Autores: R.I.R Macías, E. Lozano, M.J. Monte, **L. Sánchez-Vicente**, E. Herráez, O. Briz, J.J.G Marín. Título: Role of bile acids as cocarcinogenic agents in the development of cholangiocarcinoma. Tipo de comunicación: Póster.

Congreso: VI Jornadas Científicas del CIBERehd. Barcelona, 2012. Autores: R.I.R Macías, E. Lozano, M.J. Monte, **L. Sánchez-Vicente**, E. Herráez, A.G. Blazquez, O. Briz, J. Banales, L. Bujanda, J.J.G Marín Título: Role of bile acids as cocarcinogenic agents in the development of cholangiocarcinoma. Tipo de comunicación: Póster. (Premiado "Mejor comunicación tipo póster").

AGRADECIMIENTOS

La escritura de esta Tesis Doctoral supone el fin de una etapa de la que puedo destacar que ante todo he aprendido. Adquirí conocimientos y destreza en el trabajo propio de un laboratorio de investigación, aprendí a organizarme y a recuperar el gusto por las cosas bien hechas y también aprendí que siempre hay que sacar algo positivo, hasta de las cosas menos buenas; pues, en definitiva, experimenté que todo esfuerzo implica una recompensa, aunque no sea inmediata. Y mi recompensa se ha visto traducida en una enorme sensación de satisfacción por el trabajo que he realizado.

Por ello, quisiera tener en cuenta a todas aquellas personas por las que me he sentido rodeada y respaldada durante este tiempo y expresarles mi agradecimiento:

A todos los integrantes del Hevefarm:

- Al Dr. José Juan García Marín, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por su ayuda, sus lecciones y consejos; en definitiva, por dirigir mi trabajo y enseñarme a interpretar los resultados tanto a nivel científico como personal.
- Al Dr. Óscar Briz Sánchez, por su inmensa ayuda y su infinita paciencia, sobretodo en la etapa final de mi investigación y durante la escritura de este manuscrito; por sus palabras de ánimo y la alegría compartida cuando los resultados obtenidos eran los esperados. Te deseo lo mejor y no llegues a perder nunca el entusiasmo y la ilusión.
- A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por inculcarme los buenos hábitos del trabajo en un laboratorio, por su exigencia ante las cosas no hechas del todo bien y sus consejos en la dirección de esta Tesis Doctoral.
- A la Dra. María Ángeles Serrano García porque, aunque sus responsabilidades la han mantenido alejada físicamente del laboratorio, siempre ha mostrado gran interés por mí y la he sentido cercana.
- A la Dra. María Jesús Monte Río, de la que admiro su capacidad de organización y de desempeñar un trabajo bien hecho desde la dirección de mi tesina y a la que he sentido siempre muy cerca. Gracias por tu confianza, ha sido un placer ser tu “pinche” del HPLC-MS/MS durante estos años.
- A la Dra. Rocío Rodríguez Macías, por abrirme las puertas del grupo del que he formado parte estos años y por esa simpatía que tanto le caracteriza.

- A la Dra. M^a José García Pérez, por su buen humor “a base de capuchinos”, su interés por mí, sus ánimos y por conseguir sacarme una sonrisilla día tras día.
- A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por su gran amabilidad, su disposición y sus muestras de agradecimiento ante las pequeñas cosas.
- A la Dra. Alba María García Blázquez, por ser desde el principio una persona tan cercana y afín a mí y ofrecerme todo su apoyo, su confianza y ayuda.
- A la Dra. Elisa Lozano Esteban, mi antecesora, por ser tan natural, tan humilde y tan buena persona; por sus ánimos y su ayuda y por resolver mis dudas ante los plazos y los trámites administrativos.
- A las recientes incorporaciones en el grupo, a Ruba y a Faten, para que nunca pierdan la ilusión de quien inicia su aventura en el mundo de la investigación y a las que deseo mucha suerte en su etapa predoctoral.
- A todos aquellos compañeros que formaron parte del Hevefarm y a los que recuerdo con un cariño especial: Pablo, Rubén, Olivia, Javi y Ester. A estos últimos les deseo mucha suerte en su etapa postdoctoral.
- A todos los tesinandos que realizaron su trabajo en este grupo de investigación, en especial, a Ana Belén y a Manu; y a los actuales: Lara, Laura P. Silva, Eduardo, Rocío, Rocío, Laura, Marta y Ángela, para que nunca pierdan el ánimo de luchar por lo que quieren.

Al personal de servicios y compañeros doctorandos del Edificio Departamental, de un modo especial:

- A los técnicos y auxiliares de laboratorio, en especial a Narcí, por el buen quehacer desempeñado en nuestro laboratorio y por ese sentido del humor que tanto la caracteriza y que nos contagia. También quisiera agradecer a Tomi, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y a Elvira, del Departamento de Microbiología y Genética, su dedicación y ayuda en la obtención de bacterias competentes.
- A Maribel, por su excelente labor en la Secretaría del Departamento de Fisiología y Farmacología y su simpatía.
- Al personal de limpieza, de manera especial, a Teresa y a Luisa, por cuidarme tanto.

- Al servicio de Conserjería por los servicios prestados.
- A mi compañero “biotec” José Manuel Muñoz Félix, con el que tanto he coincidido en el pasillo y al que nunca le han faltado palabras de ánimo. Gracias y mucha suerte en el final de tu etapa predoctoral.

A mi familia:

- A mis padres, porque son mi mayor ejemplo de esfuerzo y dedicación, por dárme todo, por quererme tanto y apoyarme en todo momento.
- A mis abuelos y abuelas, por ser y haber sido tan especiales en mi vida.
- A mis tíos y a los grandes amigos de mis padres a los que también considero como tal; a mis primos, pues sabéis que para mí sois mis hermanos. Gracias a todos por quererme tanto, por preocuparos por mí y ser partícipes de los buenos y no tan buenos momentos de la vida.

A Rodrigo, por ser lo mejor que me ha ocurrido en estos años, por su intento por hacer de mí una persona menos frágil a base de consejos, de ayuda y apoyo constante.

A mis amigos y amigas y todas aquellas personas que me habéis dedicado parte de vuestro tiempo para interesaros por mí y dirigirme palabras de ánimo y apoyo a lo largo de mi doctorado:

- A mis “Amigas Forever” Raquel, Mayte, Estela, Rosa, Verónica y Cristina. Sabéis que esto se tiene que celebrar.
- A mis amigas “biotec”, de manera muy especial a Raquelilla, Cova y María.
- A Alberto, Jérica y Rosa, Raúl, Sor Julia, Pedro y Rafa, Cris, Sandra, Manu, a mi vecino Juanjo y a mi gente de Irlanda e Inglaterra que, a pesar del distanciamiento, sigo llevando en mi corazón.
- Al Dr. Javier Butrón, Director del Departamento de Biotecnología del CNTA (Navarra), por depositar un voto de confianza en mí, por la amistad que nos une y por esa fuerza y ánimo que me ha transmitido y me ha resultado tan valiosa cuando más frustrada me he sentido. No olvides que tú también vales mucho y no abandones ese empeño por conseguir sacar una sonrisa a las personas de tu alrededor.

- Al grupo folklórico Surco porque, además de permitirme disfrutar de mi hobby rodeada de gente tan profesional, sois la alegría de la huerta y sacáis la mejor parte de mí bailando, cantando y llorando de la risa (aquí también incluyo al Subsurco y los Surquitos/as). Habéis sido mi mejor medicina durante estos años, ya que con vosotros es posible desconectar.

A todas las personas que pasaron por mi vida y de las que aprendí o me llevé algo, por inculcarme valores esenciales para mí..., en definitiva, por haberme permitido con vuestra aportación llegar hasta aquí.

*Dedicada a
mis padres y abuelos*

ABREVIATURAS FRECUENTES

| | |
|-----------|--|
| λ | longitud de onda |
| 6-4PP | fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona |
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> |
| ADC | ácido desoxicólico |
| ADNc | ADN complementario |
| AGC | ácido glicocólico |
| AGQDC | ácido glicoquenodesoxicólico |
| AGUDC | ácido glicoursodesoxicólico |
| ALC | ácido litocólico |
| AP | sitio abásico |
| AQDC | ácido quenodesoxicólico |
| ATP | adenosina trifosfato |
| AUDC | ácido ursodesoxicólico |
| BER | reparación por escisión de bases |
| CAT | cloranfenicol acetiltransferasa |
| CGamF | colilglicilamidofluoresceína |
| CGC | colangiocarcinoma |
| Ct | ciclo umbral |
| D.O. | densidad óptica |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol |
| DBO | demanda bioquímica de oxígeno |
| DDR | respuesta al daño en el ADN |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| dNTP | desoxinucleótido trifosfato |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| EEM | error estándar de la media |
| EGFP | <i>enhanced GFP</i> |
| FBS | suero bovino fetal |
| FITC | isotiocianato de fluoresceína |
| Fw | <i>forward</i> |
| GFP | proteína verde fluorescente |
| GRE | elemento de respuesta a glucocorticoides |
| HCC | carcinoma hepatocelular |
| HEPES | ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico |
| HR | recombinación homóloga |

| | |
|--------|---|
| IP | ioduro de propidio |
| kb | kilobase |
| kDa | kilodalton |
| LB | medio Luria-Bertani |
| Luc2 | luciferasa de luciérnaga |
| MDR | resistencia a múltiples fármacos |
| MGMT | O6-metilguanina-ADN metiltransferasa |
| MIP | polímero de impresión molecular |
| MMR | reparación de apareamientos erróneos de bases del ADN |
| MOC | mecanismo de quimiorresistencia |
| MOI | multiplicidad de infección |
| MOPS | ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico |
| MTT | tiazol azul de tetrazolio |
| NER | reparación por escisión de nucleótidos |
| NHEJ | unión de extremos no homólogos |
| OATP | polipéptido transportador de aniones orgánicos |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| pb | pares de bases |
| PBS | tampón fosfato salino |
| PEI | polietilenimina |
| pL | <i>promotor-less</i> |
| PNA | ácido nucleico peptídico |
| prCMV | promotor del citomegalovirus |
| prEF1a | promotor del factor de elongación humano 1 α |
| prMRP2 | promotor de MRP2 |
| prRecA | promotor de <i>RecA</i> |
| RT | transcripción reversa |
| Rv | <i>reverse</i> |
| SD | desviación estándar |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| SLC | <i>solute carrier</i> |
| TAA | tioacetamida |
| TEMED | tetrametiletildiamina |
| Tris | tris(hidroximetil) aminometano |
| UA | unidades arbitrarias |
| UV | ultravioleta |

| | |
|--|-----------|
| 1. OBJETIVOS..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 2.1. BIOSENSORES | 7 |
| 2.1.1. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y GENERALIDADES | 7 |
| 2.1.2. ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO | 8 |
| 2.1.3. TRANSDUCTORES..... | 15 |
| 2.1.4. PROPIEDADES DE LOS BIOSENSORES | 16 |
| 2.1.5. APLICACIONES DE LOS BIOSENSORES..... | 17 |
| 2.1.6. BIOSENSORES MICROBIANOS | 18 |
| 2.1.6.1. VENTAJAS DEL USO DE MICROORGANISMOS | 18 |
| 2.1.6.2. TIPOS DE BIOSENSORES MICROBIANOS..... | 19 |
| 2.2. GENOTOXICIDAD Y REPARACIÓN DEL ADN | 23 |
| 2.2.1. TIPOS DE DAÑOS EN EL ADN | 24 |
| 2.2.2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN..... | 26 |
| 2.2.2.1. REVERSIÓN DIRECTA..... | 26 |
| 2.2.2.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN..... | 29 |
| 2.2.2.3. REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA..... | 35 |
| 2.2.2.4. RESPUESTA SOS | 37 |
| 2.2.3. ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD | 39 |
| 2.3. QUIMIORRESISTENCIA DEL CÁNCER DE HÍGADO..... | 42 |
| 2.3.1. TRATAMIENTOS DISPONIBLES..... | 42 |
| 2.3.2. LIMITACIONES DE LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL ACTUAL | 43 |
| 2.3.3. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA | 44 |
| 2.3.3.1. PAPEL DEL TRANSPORTOMA EN QUIMIORRESISTENCIA TUMORAL .. | 45 |
| | 45 |
| 2.3.3.2. DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DEL FÁRMACO (MOC-2)..... | 49 |
| 2.3.3.3. CAMBIOS EN LAS DIANAS MOLECULARES (MOC-3) | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.3.4. CAMBIOS EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN (MOC-4) | 50 |
| 2.3.3.5. CONTROL DEL BALANCE SUPERVIVENCIA/APOPTOSIS (MOC-5) | 51 |
| 2.3.4. PREDICCIÓN DE LA QUIMIORRESISTENCIA EN EL CÁNCER DE HÍGADO... | 52 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 55 |
| 3.1. MATERIAL | 57 |
| 3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO | 57 |
| 3.1.2. PRODUCTOS Y OTRO MATERIAL | 58 |
| 3.1.3. MEDIOS INSTRUMENTALES | 62 |
| 3.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATA | 65 |
| 3.2.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO | 65 |
| 3.2.2. OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE LA TIOACETAMIDA | 66 |
| 3.3. CULTIVO DE BACTERIAS | 66 |
| 3.3.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO | 66 |
| 3.3.2. SIEMBRA DE BACTERIAS | 67 |
| 3.3.3. SELECCIÓN DE COLONIAS Y CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO | 67 |
| 3.3.4. CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO SIN SELECCIÓN DE COLONIAS | 68 |
| 3.3.5. PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO DE CULTIVOS DE BACTERIAS | 68 |
| 3.3.6. CONGELACIÓN DE BACTERIAS | 68 |
| 3.3.7. ESTUDIOS DE TOXICIDAD EN BACTERIAS | 69 |
| 3.3.8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN <i>recA</i> | 70 |
| 3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR | 70 |
| 3.4.1. DISEÑO DE CEBADORES | 70 |
| 3.4.2. PCR ANALÍTICA | 71 |
| 3.4.3. PCR ANALÍTICA DE ALTA FIDELIDAD | 71 |
| 3.4.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA NO DESNATURALIZANTE | 72 |
| 3.4.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DESNATURALIZANTE | 72 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.6. PURIFICACIÓN DEL ADN CONTENIDO EN GELES DE AGAROSA Y REACCIONES ENZIMÁTICAS..... | 72 |
| 3.4.7. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN | 73 |
| 3.4.8. SECUENCIACIÓN | 73 |
| 3.5. TÉCNICAS DE CLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN GATEWAY | 73 |
| 3.5.1. CLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN GATEWAY..... | 73 |
| 3.5.2. CLONACIÓN CLÁSICA | 79 |
| 3.6. CULTIVOS CELULARES | 81 |
| 3.6.1. CULTIVO, PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS | 82 |
| 3.6.2. ESTUDIOS DE TOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA | 82 |
| 3.6.3. TRANSFECCIÓN CON LÍPIDOS CATIÓNICOS..... | 83 |
| 3.7. DETERMINACIÓN DEL ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA | 85 |
| 3.7.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL | 85 |
| 3.7.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)..... | 85 |
| 3.7.3. ELIMINACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO DE LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS..... | 86 |
| 3.7.4. PCR CUANTITATIVA | 86 |
| 3.7.5. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS RESULTADOS | 87 |
| 3.8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA | 88 |
| 3.8.1. INMUNODETECCIÓN | 88 |
| 3.8.2. MICROSCOPIA CONFOCAL | 88 |
| 3.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT | 89 |
| 3.9.1. OBTENCIÓN DE LISADOS DE CÉLULAS HUMANAS | 89 |
| 3.9.2. PREPARACIÓN DE LOS GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA..... | 89 |
| 3.9.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS..... | 90 |
| 3.9.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) | 90 |
| 3.9.5. TRANSFERENCIA A UNA MEMBRANA DE NITROCELULOSA..... | 90 |
| 3.9.6. INMUNODETECCIÓN | 91 |

| | |
|--|------------|
| 3.10. PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES | 91 |
| 3.10.1. FUNDAMENTO | 91 |
| 3.10.2. PRODUCCIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES | 92 |
| 3.10.3. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL | 92 |
| 3.10.4. DETERMINACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN (MOI) Y CONDICIONES DE TRANSDUCCIÓN ÓPTIMAS..... | 93 |
| 3.10.5. TRANSDUCCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA | 93 |
| 3.11. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO | 94 |
| 3.11.1. FUNDAMENTO | 94 |
| 3.11.2. PROCEDIMIENTO | 94 |
| 3.12. MÉTODOS ANALÍTICOS | 95 |
| 3.12.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES | 95 |
| 3.12.2. TEST DEL AZUL DE TRIPÁN | 95 |
| 3.12.3. TEST DE FORMAZÁN | 96 |
| 3.12.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA | 96 |
| 3.12.5. DETERMINACIÓN DE PLATINO Y CROMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA..... | 97 |
| 3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 97 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 99 |
| 4.1. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE GENOTOXICIDAD DE COMPUESTOS ENDÓGENOS Y XENOBIÓTICOS | 101 |
| 4.1.1. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES SOS TRAS LA EXPOSICIÓN A CISPLATINO | 102 |
| 4.1.2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2 | 104 |
| 4.1.3. PUESTA A PUNTO DE LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2..... | 106 |
| 4.1.4. VALIDACIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2: ELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA..... | 114 |
| 4.1.5. VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE GENOTOXICIDAD BASADO EN EL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2..... | 116 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.6. APLICACIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2 EN LA DETECCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS A NIVEL MEDIOAMBIENTAL | 118 |
| 4.1.7. APLICACIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2 EN LA DETECCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS A NIVEL AGROALIMENTARIO . | 128 |
| 4.1.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LOS ÁCIDOS BILIARES Y SU IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO DEL COLANGIOCARCINOMA. | 131 |
| 4.2. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR BASADA EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE MRP2 Y LA PROTEÍNA DE CAPTACIÓN DE FÁRMACOS OATP1B1..... | 139 |
| 4.2.1. ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE MRP2 EN CÉLULAS ALEXANDER..... | 141 |
| 4.2.2. CONSTRUCCIÓN DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 | 145 |
| 4.2.3. EXPRESIÓN DE OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA TRANSITORIA CON prMRP2-OATP1B1 | 146 |
| 4.2.4. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA TRANSITORIA | 150 |
| 4.2.5. EFECTO DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 INTRODUCIDO DE FORMA TRANSITORIA EN CÉLULAS TUMORALES QUIMIORRESISTENTES | 153 |
| 4.2.6. DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS RECOMBINANTES prMRP2-OATP1B1 | 157 |
| 4.2.7. EXPRESIÓN ESTABLE DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER..... | 163 |
| 4.2.8. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA ESTABLE | 166 |
| 4.2.9. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EXPRESADO DE FORMA ESTABLE EN CÉLULAS QUIMIORRESISTENTES | 169 |
| 4.3. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR BASADA EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE BIRC5 Y LA PROTEÍNA DE CAPTACIÓN DE FÁRMACOS OATP1B3 | 176 |
| 4.3.1. CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE BIRC5..... | 177 |
| 4.3.2. EXPRESIÓN DE OATP1B3 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA TRANSITORIA CON prBIRC5-OATP1B3 | 181 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.3. EXPRESIÓN ESTABLE DEL GEN QUIMÉRICO prBIRC5-OATP1B3 EN CÉLULAS ALEXANDER..... | 184 |
| 4.3.4. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prBIRC5-OATP1B3 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA ESTABLE | 187 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 193 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 197 |

*Desarrollo de nuevas
herramientas biotecnológicas para
la manipulación de la
quimiorresistencia y como
biosensores de agentes
genotóxicos*



1. OBJETIVOS

Muchos de los fármacos que se utilizan en la lucha contra el cáncer atacan el material genético de las células tumorales en proliferación, favoreciendo la aparición de daños en el ADN que determinan el destino de estas células por la activación de la apoptosis. Paradójicamente la lesión del ADN es una de las causas principales de carcinogénesis. Las células sanas cuentan con mecanismos que las defienden de la genotoxicidad y cuando se convierten en células tumorales son causa de quimiorresistencia.

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente químico, físico o biológico de ocasionar daño en el material genético, pudiendo dar lugar a efectos biológicos adversos, tales como la mutagénesis, la carcinogénesis y/o la teratogénesis. Dado el riesgo para la salud que conlleva la exposición a agentes genotóxicos, resulta de vital importancia desarrollar ensayos que permitan caracterizarlos y detectarlos, así como evaluar el daño causado por los mismos.

Como ya se ha mencionado, la exposición a agentes genotóxicos, entre otras causas, puede favorecer la carcinogénesis. El cáncer es uno de los principales problemas de salud en el mundo, siendo la segunda causa más frecuente de muerte. El carcinoma hepatocelular que representa casi el 85% de los tumores malignos primarios del hígado, se encuentra entre los que presentan una mayor refractariedad al tratamiento farmacológico.

El desarrollo de resistencia tumoral a fármacos citostáticos es una de las principales causas que comprometen el éxito de la quimioterapia. Entre los mecanismos que desencadenan la aparición de quimiorresistencia destacamos la sobreexpresión de transportadores pertenecientes a la familia ABC, que aumentan la capacidad de las células tumorales de reducir la concentración intracelular de un fármaco a niveles menos tóxicos; y el incremento de la actividad de proteínas antiapoptóticas.

Además de la resistencia que desarrollan algunos tipos de tumores frente a los fármacos antineoplásicos, la quimioterapia presenta otros inconvenientes como su toxicidad elevada y su inespecificidad, por afectar también a células sanas. De ahí la importancia de conseguir vectorizar o dirigir de manera específica los fármacos citostáticos hacia el tumor, así como de identificar las alteraciones moleculares o los mecanismos celulares que controlan la sensibilidad o la resistencia a los agentes quimioterapéuticos; lo que permitiría poder llevar a cabo un tipo de medicina más personalizada a través de la aplicación clínica de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la terapia génica.

Atendiendo a estos antecedentes, nos planteamos como **objetivo global de esta Tesis Doctoral** el diseño de herramientas biotecnológicas basadas en la tecnología del ADN recombinante para desarrollar un biosensor de genotoxicidad y estrategias de terapia génica para superar la quimiorresistencia tumoral.

Este objetivo general engloba los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Desarrollar un biosensor basado en la respuesta SOS bacteriana que permita evaluar el potencial genotóxico de agentes con interés relevante en las áreas medioambiental, agroalimentaria y biosanitaria.

Objetivo 2: Desarrollar una estrategia de terapia génica basada en la actividad transcripcional del promotor de un gen como el *ABCC2*, que controla la expresión de la proteína de quimiorresistencia MRP2, para fusionarlo a una proteína de captación de fármacos citostáticos, como OATP1B1, con el fin de mejorar la eficacia de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer hepático.

Objetivo 3: Desarrollar una estrategia de terapia génica basada en la actividad transcripcional de un promotor muy activo solamente en células tumorales como el del gen *BIRC5*, que regula la expresión de la proteína antiapoptótica survivina implicada en la quimiorresistencia tumoral, para fusionarlo a una proteína de captación de fármacos citostáticos, como OATP1B3, a fin de mejorar la eficacia de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer hepático.

*Desarrollo de nuevas
herramientas biotecnológicas para
la manipulación de la
quimiorresistencia y como
biosensores de agentes
genotóxicos*



2. INTRODUCCIÓN

2.1. BIOSENSORES

2.1.1. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y GENERALIDADES

Un biosensor, por definición, es un dispositivo analítico que consta de un elemento de reconocimiento o receptor, biológico o biomimético (sintetizado artificialmente pero imita a lo biológico), asociado a un sistema de transducción que detecta la respuesta del receptor ante el reconocimiento de un determinado analito y genera una señal cuantificable, proporcional a la concentración del analito reconocido (Su, 2011; Velasco-García, 2003).

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el receptor y un compuesto o analito, que va a dar como resultado una variación de una o varias propiedades físico-químicas. El transductor detecta, mide y/o convierte esta respuesta biológica para generar una señal cuantificable que puede correlacionarse con la concentración del analito. La señal generada por el transductor puede ser amplificada y/o procesada en el caso de que no pueda interpretarse de manera directa.

El primer biosensor fue fabricado por Clark y Lyons en 1962 (Clark, 1962). Se trataba de un analizador de glucosa constituido por una enzima glucosa oxidasa, que actuaba como elemento de reconocimiento de la glucosa, acoplada a un electrodo de oxígeno que funcionaba como transductor; la glucosa era oxidada por la actividad enzimática y, como consecuencia, se producía un descenso proporcional de la concentración de oxígeno en la muestra, que era detectado por el electrodo.

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo a la naturaleza del elemento de reconocimiento, a la forma de interactuar con el analito y al tipo de transductor (Figura I-1). Cada uno de ellos se describirá detalladamente en los apartados 2.1.2. y 2.1.3.

Teóricamente se admiten diversas combinaciones entre los receptores y los transductores. Sin embargo, la elección del elemento de reconocimiento se hace en base al tipo de compuesto que se desee detectar y el tipo de transductor a emplear viene condicionado por el receptor elegido y por la propiedad que es modificada tras la detección del analito.

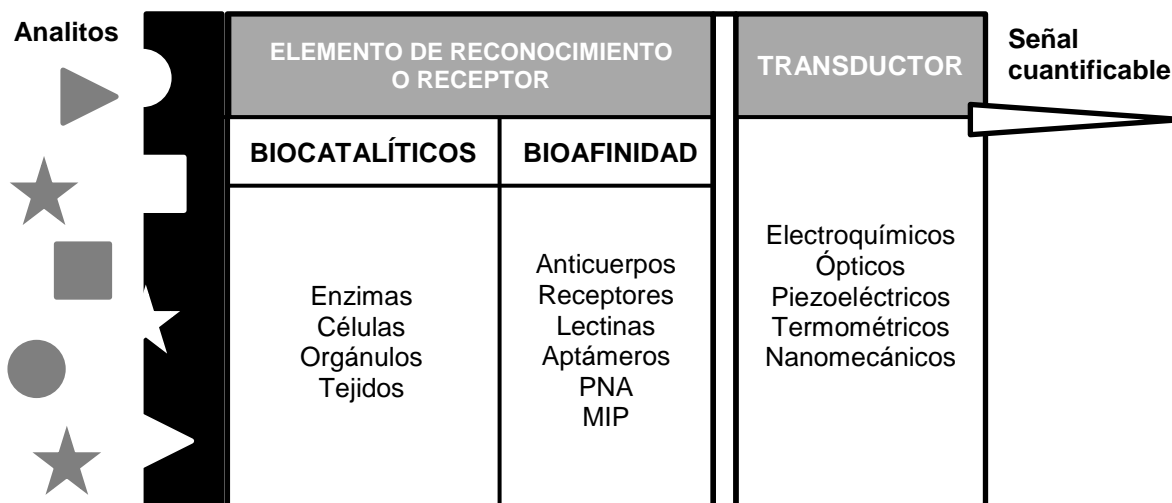


Figura I-1. Representación esquemática de un biosensor.

2.1.2. ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO

En la fabricación de biosensores se han usado como elementos de reconocimiento sistemas biológicos, como receptores, anticuerpos, lectinas, enzimas, orgánulos, microorganismos, células animales y vegetales e incluso tejidos (Byfield, 1994); y elementos biomiméticos, como polímeros de impresión molecular (MIP), aptámeros y ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Nakamura, 2003; Velasco-García, 2003).

Los propios receptores o, en general, los biosensores clasificados según la naturaleza del elemento de reconocimiento, se pueden dividir a su vez en biocatalíticos o de bioafinidad en función del tipo de interacción con el analito (Nakamura, 2003) (Figura I-1): los biocatalíticos son sistemas *in situ* en los que el receptor biológico puede catalizar una reacción química que genera un producto o desencadena una respuesta biológica detectable y medible, sin que el biocatalizador se consuma; mientras que los de bioafinidad se caracterizan por la capacidad del elemento de reconocimiento para formar un complejo con el analito que se quiere detectar, sin que ocurra una transformación química, maximizando la unión entre ambos hasta el punto de poder llegar a saturarse.

La forma de obtención de los elementos de reconocimiento ha evolucionado a lo largo del tiempo. Inicialmente, eran aislados de los propios sistemas biológicos; más recientemente, se están obteniendo por síntesis artificial o a partir de su producción

mediante técnicas biotecnológicas basadas en la tecnología del ADN recombinante y la ingeniería de proteínas (Chambers, 2008; Nakamura, 2003).

A continuación, se resaltarán las propiedades de los elementos o sistemas mencionados anteriormente, que hacen posible su función como elementos de reconocimiento de los biosensores:

- **Enzimas**

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que funcionan como catalizadores biológicos regulables. Su alta especificidad y eficiencia de reacción, así como la variedad de productos de reacción medibles que originan tras el proceso catalítico, entre los que se incluyen protones, electrones, luz y calor; son sus propiedades más destacadas que las hacen atractivas para ser usadas como elementos de reconocimiento de un biosensor (Arikawa, 1998; Chambers, 2008).

Se ha logrado aislar enzimas de diferentes organismos a pesar de que los procedimientos tanto de extracción como de purificación enzimática pueden resultar laboriosos. Algunas propiedades de las enzimas, tales como el tiempo de vida media y la termoestabilidad, han sido mejoradas a través de modificaciones como la sustitución de aminoácidos por mutagénesis dirigida (Sode, 2000; Watanabe, 1998), aportando una mayor eficacia analítica al biosensor.

- **Células**

El reconocimiento molecular de un analito puede ser llevado a cabo por una célula en su conjunto o por un componente celular específico. La mayor parte de los biosensores desarrollados aprovechan las propiedades catalíticas de las células, que se consideran como una fuente de enzimas junto con sus cofactores en el ambiente óptimo, logrando una mayor estabilidad del biosensor (D'Souza, 2001). Por ello, se presentan como una alternativa al uso de enzimas libres.

La elección de células como elementos de reconocimiento biológico permite las opciones de trabajar con células viables o no viables. En los casos en los que la aplicación de un biosensor requiera de la regeneración de cofactores o de la actividad metabólica respiratoria, han de mantenerse vivas, bien sea para la monitorización tanto de sustratos como de inhibidores de los procesos enzimáticos (D'Souza, 2001). Por otra parte, cuando el transporte de compuestos al interior celular suponga una limitación para que el biosensor genere una respuesta adecuada, se puede optar por

la utilización de células no viables obtenidas por diferentes métodos, como la permeabilización, pero que siguen siendo una fuente de enzimas intracelulares (D'Souza, 2001).

- **Orgánulos celulares**

Los orgánulos celulares pueden ser considerados como biocatalizadores multifuncionales con una complejidad intermedia entre las células y las enzimas (D'Souza, 2001). Determinados procesos metabólicos en los que están implicados les confieren especificidad y la posibilidad de monitorizar diferentes metabolitos; de ahí que se hayan desarrollado biosensores que usan, como elementos de reconocimiento biológico, orgánulos celulares como los cloroplastos (Loranger, 1994).

- **Tejidos**

Los tejidos, a diferencia de las células y los orgánulos celulares, tienen la ventaja de la cohesión, cuentan con una estructura robusta para adherirse a un transductor sin necesidad de recurrir a técnicas de inmovilización celular o de proteínas (Byfield, 1994).

- **Anticuerpos**

La utilización de anticuerpos como elementos de reconocimiento biológico viene dada por la sensibilidad y especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, basada en el acoplamiento de una parte del antígeno con los aminoácidos constituyentes del sitio de unión del anticuerpo que confieren la especificidad a la reacción. Los biosensores que emplean anticuerpos en el reconocimiento molecular constituyen uno de los sistemas de detección más rápidos (Chambers, 2008).

Su popularidad se incrementó con la aplicación de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas, desarrollada por Kohler y Milstein (Kohler, 1975). Con ella se consigue aumentar la especificidad de los mismos, ya que reconocen tan solo un epítipo del antígeno a diferencia de los anticuerpos policlonales; y, además, permite la generación de grandes cantidades de estas moléculas. Su producción ha experimentado mejoras adicionales, en cuanto al tiempo de producción y el gasto económico, con la implantación de la tecnología de los anticuerpos recombinantes.

- **Receptores**

Los receptores son tanto proteínas transmembrana como proteínas solubles que se unen a ligandos específicos, los cuales inducen un cambio conformacional en el receptor pudiendo desencadenar diversas respuestas biológicas a nivel celular. Aunque su uso como elementos de reconocimiento biológico está justificado por proporcionar alta especificidad y afinidad al biosensor, existen desventajas tales como su inestabilidad, bajo rendimiento y la dificultad para aislar y purificar las proteínas asociadas a la membrana (Chambers, 2008).

- **Lectinas**

Las lectinas son constituyentes de una familia de proteínas que se caracterizan por su capacidad de unión específica y reversible a diferentes tipos de carbohidratos, propiedad que les ha conducido a ser explotadas como elementos de reconocimiento para la detección de este tipo de moléculas (Kim, 1990). Un ejemplo de lectina ampliamente usada con esta finalidad es la concanavalina A.

- **Aptámeros**

Los aptámeros son secuencias cortas de ácidos nucleicos (ADN y ARN) de cadena sencilla que se aíslan de librerías de oligonucleótidos por un proceso de selección *in vitro* denominado SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment") (Ellington, 1990; Tuerk, 1990). Tienen la capacidad de plegarse sobre sí mismos debido al anillamiento de los nucleótidos, generando estructuras tridimensionales. También son considerados aptámeros enzimas de ADN y ARN denominadas aptazimas, que catalizan diferentes reacciones de ligación, fosforilación, autorreplicación, etc. (Hesselberth, 2003).

Los aptámeros reconocen a sus dianas principalmente por su forma y no por su secuencia (Lim, 2005). Se unen con afinidad y especificidad elevadas a un amplio rango de dianas que engloban una variedad de moléculas, entre ellas, proteínas como la trombina (Sumikura, 1997), esteroides como los ácidos biliares (Kato, 2000), iones metálicos, células y virus (Yan, 2005). Además, son resistentes a la desnaturalización y a la degradación. Estas propiedades junto con su facilidad de síntesis y de almacenamiento hacen de los aptámeros un tipo de elementos de reconocimiento de uso común y, además, resultan atractivos para el diseño de biosensores en formato de tipo *array* (Lee, 2000).

- **Ácidos nucleicos peptídicos**

Los PNA son análogos sintéticos del ADN y el ARN constituidos por un esqueleto de monómeros (N-2-aminoetilglicina) unidos entre sí por enlaces peptídicos, sin carga negativa y que, a diferencia de los ácidos nucleicos, no contiene pentosas ni grupos fosfato; las bases nitrogenadas se unen a este esqueleto a partir de un enlace carbonil metileno (Egholm, 1993).

Estos análogos de los ácidos nucleicos presentan la capacidad de hibridación con las bases nitrogenadas de las secuencias del ADN y del ARN, por complementariedad de las bases, lo cual confiere especificidad a los biosensores. Tras el reconocimiento se pueden llegar a formar complejos de doble y triple cadena. La ausencia de carga y, por tanto, de repulsión electrostática en el esqueleto de los ácidos nucleicos peptídicos les confiere a los dúplex PNA-ADN una mayor estabilidad térmica y química que los equivalentes ADN-ADN (Egholm, 1993); además, los PNA son estables en un rango amplio de temperatura y pH y ofrecen mayor resistencia a la acción de proteasas y nucleasas (Demidov, 1994).

- **Polímeros de impresión molecular**

Los MIP son elementos de reconocimiento sintetizados artificialmente a partir del método de impresión molecular, que está basado en la creación de sitios de unión específicos para una molécula determinada que es usada como molde, en un polímero sintético (Velasco-García, 2003).

Se trata de una tecnología barata, accesible y efectiva para el desarrollo de unos receptores biológicos artificiales, caracterizados por ser sólidos, robustos, estables y con una alta especificidad para un sustrato seleccionado (Velasco-García, 2003).

2.1.2.1. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN

Resulta crucial que en un biosensor el receptor y el transductor se encuentren estrechamente asociados, para que los cambios derivados de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito tengan lugar en la proximidad del transductor y sean detectados por el mismo (D'Souza, 2001). Por ello, se han desarrollado numerosas técnicas que permiten la inmovilización de diferentes tipos de receptores directamente sobre la superficie del transductor o sobre membranas o polímeros naturales y sintéticos, y deben preservar la actividad biológica del elemento de

reconocimiento que la precise, así como favorecer una unión eficiente con el analito de interés (Bjerketorp, 2006).

La elección de la estrategia de inmovilización va a depender tanto de la naturaleza biológica del receptor y del analito como de la configuración del transductor (D'Souza, 2001), y resulta crítica ya que la respuesta del biosensor, su estabilidad analítica y su utilización a largo plazo van a estar condicionadas por ello (Lei, 2006).

Las distintas técnicas desarrolladas, clasificadas de acuerdo al método de inmovilización aplicado, se describen a continuación:

- **Métodos químicos:**

Unión covalente: Este método consiste en la formación de enlaces covalentes estables entre grupos funcionales de proteínas individuales o componentes celulares de la pared celular o de la membrana plasmática y del transductor, soporte o matriz previamente activada. Se trata de una técnica que resulta útil para inmovilizar enzimas y anticuerpos, pero no para células viables, ya que su exposición a sustancias químicas altamente reactivas y las condiciones de reacción pueden afectar a su viabilidad y llegar a causar una pérdida de la integridad celular (D'Souza, 2001).

Entrecruzamiento: Este procedimiento se basa en el uso de un agente bifuncional o multifuncional como el glutaraldehído o el cloruro cianúrico que reacciona con grupos funcionales del elemento de reconocimiento enlazando diferentes moléculas del mismo y generando una especie de entramado sobre la superficie del transductor, membranas o diferentes soportes proteicos como gelatina (Deshpande, 1986), albúmina (Loranger, 1994) y clara de huevo de gallina (Marolia, 1999). Al igual que en el caso de la inmovilización por uniones covalentes, los reactivos empleados pueden afectar a la viabilidad celular y a las biomoléculas de membrana; sin embargo, resulta útil en la estabilización de enzimas (Tyagi, 1999), orgánulos celulares (D'Souza, 1983) y preparaciones celulares no viables (D'Souza, 2001).

- **Métodos físicos:**

Estos métodos no implican la formación de enlaces covalentes. Resulta más apropiado aplicarlos cuando se requieren células viables que actúen como receptor biológico, ya que su estructura y función no van a verse alteradas (D'Souza, 2001).

Adsorción física: Es un método de inmovilización muy simple que consiste en incubar el material biológico con el soporte sobre el que se va a inmovilizar y realizar un lavado para retirar las células que no se han adsorbido. La adsorción se produce por interacciones iónicas, polares, hidrofóbicas o por el establecimiento de puentes de hidrógeno. Por lo general, se trata de una técnica que no asegura estabilidad del biosensor a largo tiempo porque puede ocurrir la desorción celular (D'Souza, 2001).

Atrapamiento físico: Las células se retienen en la proximidad de la superficie del transductor usando membranas de diálisis o de filtrado, geles o polímeros naturales o sintéticos. Una desventaja de este procedimiento de inmovilización es la resistencia a la difusión que pueda ofrecer el material de atrapamiento, que puede derivar en una baja sensibilidad del biosensor (D'Souza, 2001).

Captura pasiva o adhesión: Las células o enzimas inmovilizadas por adhesión están en contacto directo con la fase líquida que contiene el sustrato, reduciéndose en cierta medida los problemas de transferencia de masa asociados comúnmente con el método de atrapamiento físico. Se han desarrollado técnicas de inmovilización celular sobre distintos tipos de membranas o superficies poliméricas usando polietilenimina (PEI) (D'Souza, 1991).

Inmovilización bioespecífica reversible: Es una técnica basada en el uso de un elemento biológico, como las lectinas, caracterizado por unirse de forma específica y reversible a un posible elemento de reconocimiento, lo cual facilita su introducción en el biosensor y que sea eluido y repuesto cuando pierde actividad (Mattiasson, 1982).

En la inmovilización del material biológico, aplicando diferentes técnicas de las mencionadas, se han empleado membranas de diálisis, de poliacrilonitrilo y membranas porosas de policarbonato o polifitalato; polímeros sintéticos entre los que destacan la poliacrilamida, los hidrogeles basados en poliuretano, las resinas fotoentrecruzables y el alcohol polivinílico y, también, polímeros naturales como el alginato, el carragenano, la agarosa de bajo punto de fusión y el quitosano (D'Souza, 2001).

2.1.3. TRANSDUCTORES

Los transductores detectan la interacción entre un elemento de reconocimiento y el analito diana y generan una señal medible, aplicando diferentes técnicas analíticas, que se puede correlacionar con la concentración del analito. En función del modo de medida de la respuesta biológica derivada de dicha interacción, se clasifican de la siguiente manera:

- **Electroquímicos**

Por lo general forman parte de biosensores de tipo biocatalítico y su principio básico de funcionamiento consiste en la detección y medida de variaciones de las propiedades eléctricas de una solución (Murugaiyan, 2014). Se diferencian cuatro tipos de biosensores electroquímicos según el tipo de señal que detectan:

- Conductimétricos: una variación de la conductividad en el medio.
- Potenciométricos: una diferencia de potencial eléctrico.
- Amperométricos: cambios en una corriente generada por la oxidación o reducción de especies electroactivas.
- Impedimétricos: un incremento en la conductancia.

- **Ópticos**

Se basan en la medida de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz como la absorción, la fluorescencia, la luminiscencia, la dispersión o el índice de refracción.

- **Piezoeléctricos, máxicos, gravimétricos o acústicos**

Este tipo de transductores suelen formar parte de biosensores de bioafinidad. Están constituidos por materiales piezoeléctricos o cristales, que entran en resonancia por la aplicación de un campo eléctrico alterno externo. Cuando el analito que se quiere detectar se une al elemento de reconocimiento, la masa del cristal se modifica y, por consiguiente, ocurre una variación en la frecuencia de oscilación. Por tanto, detectan y miden cambios directos de masa en la superficie del biosensor.

- **Termométricos**

Miden la temperatura y detectan el calor generado o absorbido en algunas reacciones enzimáticas.

- **Nanomecánicos**

Este tipo de transductores constituidos por una micropalanca de silicio sobre la cual se inmoviliza el elemento de reconocimiento, son sumergidos en una muestra líquida y detectan una respuesta nanomecánica como consecuencia de la diferencia en la tensión superficial del líquido producida tras la interacción del analito con el receptor (Tamayo, 2013).

2.1.4. PROPIEDADES DE LOS BIOSENSORES

Las propiedades deseables de un biosensor para que efectúe un análisis adecuado son (Velasco-García, 2003):

- Especificidad: capacidad del elemento de reconocimiento del biosensor para interactuar exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares.
- Sensibilidad: capacidad de detección del biosensor. Depende tanto del receptor biológico, por su grado de interacción con el compuesto de interés, como de la eficiencia de detección del transductor (Byfield, 1994). Una alta sensibilidad del biosensor posibilita la aplicación de las muestras sin necesidad de pretratamientos que permiten concentrar y/o purificar el analito de interés para facilitar su detección, lo cual supone un ahorro de tiempo y de reactivos.
- Fiabilidad: reproducibilidad de los resultados obtenidos, que se puede conseguir minimizando los problemas de ruidos y mejorando el diseño del transductor para que no se vea alterado en presencia de la muestra.
- Bajo coste de producción, con pocos requerimientos operativos y de almacenamiento.
- Tiempo de vida largo del biosensor sin que sufra ningún tipo de deterioro desde el momento de su fabricación hasta su uso. Esto implica estabilidad química, física y mecánica del elemento de reconocimiento, que es el principal condicionante de esta característica.
- Análisis en tiempo real, que permita obtener resultados de manera inmediata y automática, lo cual resultaría interesante en el control de procesos; o que, al menos, el tiempo de análisis sea corto y no precise una larga espera hasta la obtención de los resultados.
- Capacidad multianálisis, que permita la detección de diferentes analitos de forma simultánea.

- Manejo sencillo y simplicidad de operación, que no requiera la presencia de personal cualificado para llevar a cabo el análisis.
- Portabilidad, que permita llevar a cabo análisis *in situ*.

De todas ellas, las dos primeras se consideran las propiedades más importantes con las que debe contar un biosensor (Byfield, 1994).

2.1.5. APLICACIONES DE LOS BIOSENSORES

El desarrollo de los biosensores ha estado centrado principalmente en el campo del diagnóstico clínico (Murugaiyan, 2014), habiendo alcanzado un gran éxito los biosensores enzimáticos de glucosa que dominan el mercado actual, debido a la alta prevalencia de la diabetes en los países desarrollados y la necesidad de estos pacientes de llevar un control rutinario de sus niveles de glucosa sanguínea. Sobre el biosensor primitivo basado en la enzima glucosa oxidasa asociada a un electrodo de oxígeno, se han ido introduciendo diferentes variaciones a lo largo del tiempo: el uso de glucosa deshidrogenasa como elemento de reconocimiento, la incorporación de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa que usa la pirroquinolina quinona como cofactor (Chambers, 2008), el biosensor de glucosa desarrollado por Heller en 1990 comprendía las enzimas glucosa oxidasa y bilirrubina oxidasa como elemento de reconocimiento biológico (Heller, 1990). Los avances en el campo de los sistemas micro-nanoelectromecánicos han hecho posible la creación de un biosensor de glucosa basado en uno de estos sistemas, el *microcantilever*, que se caracteriza por tener un pequeño tamaño y alcanzar límites de detección muy bajos, por debajo del orden de femtomolar en el caso de la detección de ADN del virus de la hepatitis B (Lee, 2012).

En los últimos años, los biosensores han despertado un gran interés en las áreas medioambiental, alimentaria, química y farmacéutica por su aplicabilidad en la detección de sustancias determinadas y, como consecuencia, en el control y la seguridad (González-Rumayor, 2005). Suponen el mayor campo de aplicación de los biosensores microbianos, que pueden llevar a cabo funciones metabólicas que derivan en análisis concretos tanto de contaminantes ambientales, como de alimentos y compuestos con acción farmacológica y en el seguimiento de procesos de fermentación. Algunos de estas aplicaciones se enumerarán de manera más específica en el apartado 2.1.6.

2.1.6. BIOSENSORES MICROBIANOS

Los biosensores microbianos surgen de la combinación de un microorganismo con un transductor con el fin de detectar un analito determinado (D'Souza, 2001).

2.1.6.1. VENTAJAS DEL USO DE MICROORGANISMOS COMO ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO

De los diferentes elementos de reconocimiento biocatalíticos empleados en la fabricación de biosensores, las enzimas han sido las más utilizadas debido a su elevada especificidad de sustrato, pero también presentan algunas limitaciones: su aplicación requiere un paso previo de extracción de la fuente biológica y purificación que resulta costoso, las enzimas purificadas no resultan siempre estables y pueden requerir de la presencia de cofactores para llevar a cabo su actividad (Arikawa, 1998). El uso de células como fuente de enzimas intracelulares, y no las propias enzimas aisladas, se presenta como una alternativa mejor en los procesos industriales ya que, además de evitar el proceso de purificación enzimática, las enzimas se mantendrían en su ambiente natural y, por tanto, en condiciones óptimas para su actividad, se prevendría su inactivación por compuestos tóxicos externos y proporcionarían la posibilidad de operar con cascadas de señalización enzimática (Arikawa, 1998; D'Souza, 2001).

Así pues, el uso de células ha adquirido gran importancia en la fabricación de biosensores. En concreto, los microorganismos ofrecen una serie de ventajas frente a las células de organismos superiores, puesto que presentan una tasa de reproducción más alta pudiendo producirlos de forma masiva en cultivo, resultan más fáciles de manipular y tienen una mayor viabilidad y estabilidad *in vitro* (Byfield, 1994). Otras de sus ventajas son la capacidad de detectar y metabolizar un amplio abanico de sustancias químicas, adaptarse a condiciones de temperatura y pH adversas o no óptimas; así como la posibilidad de ser modificados genéticamente (D'Souza, 2001; Lei, 2006). Aunque, *a priori*, la capacidad de los microorganismos de responder a un amplio rango de compuestos químicos por la acción catalítica de diferentes enzimas, pudiera dar pie a pensar en la falta de especificidad de los biosensores microbianos, su selectividad puede lograrse aplicando unas condiciones de cultivo selectivas que favorezcan la inducción o el bloqueo de una ruta metabólica determinada y, a nivel génico, llevando a cabo modificaciones genéticas a través de la tecnología del ADN recombinante (Su, 2011).

2.1.6.2. TIPOS DE BIOSENSORES MICROBIANOS

Atendiendo al tipo de técnica en el que se basa el funcionamiento del transductor para generar una señal que pueda correlacionarse con el analito diana, los biosensores microbianos se clasifican en dos grandes grupos: electroquímicos y ópticos (Su, 2011).

- **Biosensores microbianos electroquímicos**

Amperométricos

Los biosensores microbianos electroquímicos más comunes son los amperométricos. Operan a un potencial fijo aplicado entre un electrodo de trabajo que contiene los microorganismos y un electrodo de referencia, y detectan las variaciones de corriente generadas por la oxidación o reducción de productos o de intermediarios de reacción electroactivos en la superficie del electrodo de trabajo (Lei, 2006).

El principal problema de este tipo de biosensores es la falta de eficiencia del proceso de transferencia electrónica entre el sistema biocatalítico microbiano y el electrodo (Ding, 2008). Para facilitar la transferencia electrónica, se han desarrollado una serie de estrategias como la utilización del microorganismo *Rhodospirillum rubrum*, capaz de transferir electrones a un electrodo de grafito durante la oxidación de la glucosa (Chaudhuri, 2003), y la incorporación de mediadores redox del tipo ferricianuro, los viológenos o las quinonas, que aportan una sensibilidad elevada al biosensor (Tkac, 2000). Más recientemente se han desarrollado configuraciones basadas en el empleo de electrodos de pasta de carbono, preparados con una pequeña cantidad de nanotubos de carbono que amplifican el efecto del mediador y prolongan la estabilidad del biosensor (Timur, 2007).

En lo que respecta a sus aplicaciones, los que han experimentado un mayor desarrollo científico son los destinados a determinar la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) como indicativo de polución orgánica en muestras acuosas. Permiten superar la principal limitación del método convencional aplicado para determinar este parámetro de calidad de las aguas (DBO₅), que supone un tiempo de espera de 5 días; consiguiendo una estimación precisa y rápida de la DBO y la monitorización del proceso (Jouanneau, 2014). Los biosensores de este tipo combinan el transductor, que es un electrodo de oxígeno, con microorganismos aeróbicos capaces de metabolizar y degradar contaminantes orgánicos. Para evitar que la

capacidad de degradación del biosensor se vea limitada a un abanico pequeño de sustratos, se combinan diferentes especies bacterianas para ser usadas como elemento de reconocimiento; de ahí que la investigación científica en este campo haya estado orientada fundamentalmente a la identificación de microorganismos que puedan determinar la DBO debida a un contaminante específico (D'Souza, 2001).

El segundo tipo de biosensores microbianos amperométricos que más interés científico ha acaparado son los destinados a la monitorización de etanol. Diferentes tipos de microorganismos capaces de metabolizar este alcohol han sido inmovilizados sobre un electrodo de oxígeno para fabricar biosensores de etanol, que se caracterizan por ser sensibles y estables, pero poco selectivos; de ahí que muchas investigaciones científicas estén enfocadas a mejorar la especificidad de este tipo de biosensores (Gamella, 2014).

Además de los dos tipos citados, se han diseñado biosensores microbianos amperométricos que permiten la medición de azúcares, derivados fenólicos, compuestos organofosforados utilizados como pesticidas e insecticidas, cianuro, tensioactivos o surfactantes, peróxido de hidrógeno, ácido acético, metales pesados como el cadmio y el cobre y la monitorización de la corrosión inducida por microorganismos (D'Souza, 2001).

Potenciométricos

Los transductores empleados comúnmente para este tipo de biosensores son electrodos sensibles a iones o a gases, cubiertos por microorganismos inmovilizados. Están basados en la medida de un cambio de potencial entre un electrodo de trabajo y otro de referencia, que se ha producido por la acumulación o depleción de iones como consecuencia del metabolismo microbiano de un analito determinado (Erden, 2013). La principal limitación se debe al electrodo de referencia, que tiene que ser muy estable.

Se han fabricado biosensores en los que se combinan cepas recombinantes de *Escherichia coli* con el electrodo de pH para detectar compuestos organofosforados y monitorizar penicilina (Chao, 2000; Mulchandani, 1998). El electrodo selectivo de amonio acoplado a especies de *Bacillus* ha permitido la detección de urea en leche (Verma, 2003) y el electrodo selectivo de ion cloruro combinado con una cepa modificada de *Pseudomonas aeruginosa* la monitorización del tricloroetileno (Han, 2002).

Conductimétricos

Estos biosensores detectan cambios de conductividad asociados a la producción o al consumo de especies iónicas durante la actividad metabólica de los microorganismos. Su principal ventaja es su capacidad para efectuar una medida de la conductancia extremadamente rápida y sensible; además, el biosensor en sí es fácilmente miniaturizable, puesto que no requiere de la presencia de un electrodo de referencia en el sistema (D'Souza, 2001).

- **Biosensores microbianos ópticos**

La interacción de estos biosensores con el analito de interés desencadena una señal óptica proporcional a la concentración del propio analito. La detección óptica del transductor está basada en la medida de luminiscencia, fluorescencia o color (Murugaiyan, 2014).

La gran parte de los biosensores microbianos ópticos diseñados actualmente incorporan microorganismos modificados genéticamente como elemento de reconocimiento biológico, a los que se les ha introducido un gen *reporter* fusionado al promotor de otro gen o a un gen constitutivo o inducible (Lei, 2006). En función de la aplicación del biosensor, se selecciona un gen o el promotor de un gen específico que sean regulados por la acción del analito de interés, mientras que la elección de genes que se expresan de manera constitutiva resulta adecuada en la evaluación de toxicidad global por la acción de contaminantes. Los genes *reporter* más usados son *lacZ* de *E. coli* que codifica para la β -galactosidasa, *gfp* de *Aequorea victoria* que codifica para la proteína verde fluorescente o GFP (*green fluorescent protein*), *luc* de luciérnaga y los operones *luxAB* o *luxCDABE* bacterianos que codifican para luciferasas (Sorensen, 2006).

Este tipo de biosensores se pueden clasificar atendiendo a la propiedad óptica que es modificada:

Biosensores de bioluminiscencia

La bioluminiscencia es la emisión de luz de algunos organismos vivos resultante de una reacción química (quimioluminiscencia) a partir de la cual una sustancia pasa de un estado electrónicamente excitado al estado fundamental (García-Campaña, 2001). Se trata de un fenómeno que ocurre en diferentes

organismos, tanto eucariotas, como la luciérnaga, como procariotas (Shimomura, 2006).

El fundamento de la bioluminiscencia en este tipo de biosensores les permite poder llevar a cabo la monitorización de procesos en tiempo real.

El operón *luxCDABE* ha sido muy usado como gen *reporter* en la fabricación de este tipo de biosensores. Está constituido por cinco genes estructurales: *luxA* y *B*, que codifican para las subunidades de la luciferasa; y *luxC*, *D* y *E*, que codifican para las enzimas responsables de la síntesis y el reciclaje del sustrato aldehído de la luciferasa a partir de los propios ácidos grasos de las bacterias (Meighen, 1991). Su uso como gen *reporter* permite medir la emisión de luz de forma simple sin tener que aplicar técnicas de lisis celular bacteriana y sin la necesidad de añadir el sustrato de la enzima.

Se han diseñado biosensores de bioluminiscencia con el fin de detectar metales biodisponibles como indicadores de toxicidad mediada por metales pesados (Ni^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+}), fósforo en la monitorización de nutrientes en ecosistemas, compuestos químicos tóxicos que generan estrés celular y agentes genotóxicos (Lei, 2006).

Biosensores de fluorescencia

Una de las propiedades a destacar es la sensibilidad de estos biosensores, por la técnica de fluorescencia en sí, que permite detectar bajas concentraciones del analito y el nivel de fluorescencia es dosis dependiente, de ahí que hayan sido ampliamente aplicados en el campo de la química analítica (Sorensen, 2006).

En la fabricación de este tipo de biosensores se han utilizado materiales fluorescentes sensibles al oxígeno y de forma más común el gen que codifica para la GFP. Esta proteína fluorescente confiere una serie de ventajas al biosensor: estabilidad, sensibilidad y facilidad de evaluación de su actividad sin que afecte al organismo hospedador. Su principal desventaja es el retraso comprendido entre su producción y la aparición de fluorescencia (Sorensen, 2006).

En función del elemento génico de regulación fusionado al gen *reporter* los biosensores microbianos ópticos se pueden clasificar de la siguiente forma:

Biosensores generales o no específicos

El gen *reporter* está bajo el control del promotor de un gen constitutivo, de manera que la señal óptica en este tipo de biosensores depende de un metabolismo activo desde el punto de vista funcional; por tanto, permitirán detectar compuestos tóxicos que comprometan el estado metabólico de las bacterias, causando una disminución de la emisión de luz dosis dependiente (Sorensen, 2006).

La principal limitación de este tipo de biosensores viene dada por la disminución de la actividad metabólica de los microorganismos como consecuencia de las condiciones de crecimiento, dando lugar a resultados falso-positivos (Unge, 1999). De ahí la importancia de realizar exposiciones en tiempos cortos y usar medios de cultivo definidos y ajustados a las condiciones óptimas de crecimiento.

Biosensores semi-específicos

El gen *reporter* está fusionado a un promotor de respuesta a estrés, de manera que sólo se detectará su expresión cuando los microorganismos estén sometidos a condiciones de estrés que conlleven daño en el ADN o en las proteínas (Unge, 1999). Los biosensores más comunes son los que utilizan la respuesta de choque térmico inducida por daño en las proteínas (Van Dyk, 1994) y la respuesta SOS activada por daño en el ADN (Kostrzynska, 2002).

Biosensores específicos

Están basados en la fusión de un promotor regulado junto a un gen *reporter* y, en algunos casos, también incluyen una proteína reguladora responsable de la activación o represión del promotor (Sorensen, 2006). Responden a la presencia de un compuesto concreto o condiciones determinadas.

2.2. GENOTOXICIDAD Y REPARACIÓN DEL ADN

La genotoxicidad es la capacidad de un agente químico, físico o biológico de ocasionar un daño en el material genético de los organismos, no sólo en el ADN sino también en los componentes celulares relacionados con la funcionalidad de dicho material, pudiendo originar efectos biológicos adversos, tales como la mutagénesis, la carcinogénesis y/o la teratogénesis. Dado el enorme riesgo que conlleva la exposición a genotóxicos, se han diseñado ensayos de genotoxicidad que permiten detectar

compuestos que inducen de manera directa o indirecta lesiones en el material genético por diferentes mecanismos. No obstante, ante la situación de daño en el ADN, la célula pone en marcha diferentes sistemas de reparación de las lesiones con el fin de preservar su integridad.

2.2.1. TIPOS DE DAÑOS EN EL ADN

El ADN, al igual que el resto de moléculas biológicas, es susceptible de sufrir alteraciones en su estructura. Los daños en el ADN pueden ser originados de manera espontánea o por la acción de agentes endógenos, derivados del metabolismo celular, o exógenos como la radiación UV, radiaciones ionizantes y compuestos químicos incorporados al organismo; y pueden dar lugar al bloqueo de los procesos de replicación y transcripción. Este fenómeno, junto con la incorporación de bases incorrectas en la secuencia del ADN, como consecuencia de defectos del proceso de replicación, incrementa el riesgo de aparición de mutaciones.

Algunos de los daños más comunes del ADN son provocados de manera específica por un compuesto o por la acción de diferentes agentes, tal y como se describe a continuación:

- Las principales lesiones generadas en el ADN por la absorción directa de la luz UV son los dímeros de pirimidina cis-sin ciclobutano y los fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP) (Douki, 2003). El tipo de daño más común son los dímeros de timina resultantes de la unión de dos timinas adyacentes en una misma hebra del ADN, tras la rotura de los dobles enlaces C=C de cada una de las bases y la generación de dos nuevos enlaces C-C entre ellas. Los 6-4PP se originan tras la ruptura de un doble enlace C=C en una de las bases y el doble enlace C=O de la posición 4 de la base adyacente y la formación de un nuevo enlace covalente C-C entre ambas.
- Los agentes alquilantes son compuestos que reaccionan con las bases nitrogenadas del ADN generando una amplia variedad de aductos, que comprenden desde la adición de grupos metilos hasta grupos alquilo más complejos (Beranek, 1990). El patrón de lesiones generadas por agentes alquilantes depende del número de sitios reactivos presentes en su molécula, pudiendo distinguir entre monofuncionales y bifuncionales; de su particular reactividad química según lleve a cabo sustituciones nucleofílicas del tipo S_N1 o S_N2 ; del tipo de grupo alquilo que transfiere; y del sustrato sobre el que actúa,

que puede ser ADN de cadena doble o simple. Los agentes alquilantes del tipo S_N1 reaccionan con los átomos de nitrógeno y de oxígeno extracíclico contenidos en las bases nitrogenadas, mientras que los de tipo S_N2 tan sólo reaccionan con los átomos de nitrógeno. Son considerados agentes alquilantes distintas especies reactivas electrofílicas incorporadas a través de la dieta o por inhalación del humo del tabaco; productos derivados del metabolismo celular, entre los que se incluyen diferentes especies reactivas, la S-adenosilmetionina y productos resultantes de la peroxidación de lípidos; así como algunos fármacos antitumorales (Fahrer, 2013).

- Las roturas de cadena sencilla y de cadena doble del ADN, principalmente estas últimas, son causadas de manera directa o indirecta por diferentes agentes exógenos y endógenos: radiaciones ionizantes (rayos γ y rayos X), especies reactivas de oxígeno, disfunciones en los telómeros, colapsos que se producen en las hebras de replicación como consecuencia de lesiones originadas por la luz UV y por agentes químicos, como los fármacos que actúan sobre las topoisomerasas I y II (Degrassi, 2004; Featherstone, 1999; Pandita, 2002). Las roturas de doble cadena se consideran un tipo de lesión crítica y potencialmente letal (Bassing, 2004), ya que pueden producir una amplia variedad de alteraciones genéticas, como deleciones, translocaciones, pérdida de heterocigosidad y pérdida de cromosomas (Summers, 2011).

El estrés genotóxico compromete el estado de las células; si las alteraciones del ADN no se reparan puede ocurrir una pérdida de la viabilidad celular e inestabilidad genómica, favoreciendo el desarrollo de tumores (Abbotts, 2014). Así, con el fin de preservar la integridad genómica y prevenir la aparición de mutaciones y la pérdida o la transmisión incorrecta de la información genética, los organismos responden al daño en el ADN a través de rutas de señalización celular entre las que se incluyen los puntos de control o sistemas de vigilancia del ciclo celular (“checkpoints”), que detienen el ciclo celular y activan los mecanismos de reparación asegurando que el ADN de una célula esté intacto antes de que comience la replicación y tenga lugar la división celular (Brosh, 2013); y la apoptosis, que previene la propagación de las células cuando el daño en el material genético sobrepasa la capacidad de reparación por parte de las células (Abbotts, 2014).

2.2.2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

En este apartado se describirán los distintos sistemas de reparación del ADN con los que cuentan células procariotas y eucariotas. En general, existen mecanismos que revierten de forma directa el daño en el ADN, otros cuyo principio de reparación se basa en la escisión de la región dañada seguida de la síntesis del ADN en el hueco resultante con el fin de reemplazar la lesión y, por último, mecanismos de reparación de roturas originadas en una o en ambas hebras del ADN.

2.2.2.1. REVERSIÓN DIRECTA

La manera más directa de reparar una lesión en el ADN es revertir el daño, regenerando la base adecuada, pero este tipo de reparación no es posible en la mayoría de los casos.

Los principales mecanismos de reparación por reversión directa del daño en el ADN implican a las enzimas fotoliasa, O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) y dioxigenasas.

2.2.2.1.1. FOTOLIASA

La fotoliasa es una enzima que se encarga de reparar los dímeros de timina de tipo ciclobutano generados por acción de la luz ultravioleta (Benjdia, 2012). Estos fotodímeros provocan una distorsión de la doble hélice e impiden su replicación y transcripción ya que obstaculizan el paso de las enzimas polimerasas correspondientes.

La fotoliasa es una proteína monomérica de un tamaño aproximado de 55kDa con dos cromóforos unidos de forma no covalente que actúan como cofactores. El cofactor flavín adenín dinucleótido (FADH) resulta esencial en la acción catalítica de la fotoliasa (Sancar, 2003) ya que, tras absorber luz azul comprendida entre longitudes de onda de 300 y 500 nm, transfiere desde su estado reducido (FADH¹) un electrón a un dímero de timinas causando la ruptura de los dos enlaces C-C del anillo de ciclobutano, a través del proceso conocido como fotorreactivación (Brown, 2008; Sancar, 1987).

La fotoliasa es una enzima filogenéticamente antigua, presente en organismos procariotas y también en algunos organismos eucariotas, como las plantas, invertebrados del género *Drosophila* y en algunos grupos de vertebrados, pero no se encuentra en humanos y otros mamíferos placentarios (Müller-Sterl, 2008; Sinha, 2002).

2.2.2.1.2. O6-METILGUANINA-ADN METILTRANSFERASA

En general, se habla de la enzima MGMT, también denominada O6-alquilguanina transferasa, para hacer referencia a las diferentes ADN alquiltransferasas encargadas de la reparación de los aductos generados en el ADN tras la alquilación del átomo de oxígeno de la posición 6 de la guanina. Este tipo de enzimas se han ido describiendo a lo largo del tiempo en diferentes organismos: *E. coli*, levaduras, mamíferos y otros organismos eucariotas (Mitra, 2007).

La primera MGMT se describió en *E. coli*. Se trata de la proteína Ada, codificada por el gen *ada*, que tiene un peso molecular de 39 kDa. A través de su dominio N-terminal, actúa como un activador de los genes *ada*, *alkA*, *alkB* y *aidB* implicados en la respuesta adaptativa, responsable de la resistencia bacteriana tanto a la mutagénesis como a la toxicidad inducida en células procariotas tras su exposición a dosis submutagénicas de agentes alquilantes (Samson, 1977). Ada también tiene como función, a través de su dominio C-terminal, la reparación de los aductos O6-alquilguanina y O4-alquiltimina mediante la transferencia del grupo alquilo a un residuo de cisteína de su propia secuencia, en concreto: Cys-321 (Demple, 1985); y a través de su dominio N-terminal repara lesiones metilfosfotriéster transfiriendo el grupo metilo al residuo Cys-38 (Sedgwick, 1988). La afinidad de Ada por los promotores de los cuatro genes responsables de la respuesta adaptativa se ve incrementada tras su metilación como consecuencia de la reparación del ADN (Sedgwick, 2007).

Posteriormente, se identificó el gen constitutivo *ogt* en *E. coli*, que codifica para Ogt, una segunda MGMT de 19 kDa (Potter, 1987). Se vio que esta proteína poseía una actividad MGMT residual en bacterias mutantes para el gen *ada*, que no habían desarrollado previamente respuesta adaptativa (Mitra, 2007).

La MGMT humana tiene un tamaño de 22 kDa y es codificada por el gen *MGMT* (Fang, 2005). Para llevar a cabo su actividad catalítica se transloca desde el

citósol al núcleo (Lim, 1996), donde repara los aductos del ADN, en concreto, la O6-metilguanina y la O6-cloro-etilguanina, catalizando la transferencia del grupo alquilo de una guanina modificada hasta el residuo Cys-145 de su propio sitio catalítico (Daniels, 2004). Como consecuencia, la proteína se inactiva y es degradada en el proteosoma tras su ubiquitinación (Xu-Welliver, 2002). Así, cada molécula de MGMT puede reparar tan solo un aducto O6-alquilguanina y la capacidad de reparación a nivel celular va a depender del número de moléculas de esta enzima que contenga cada célula, por lo que el sistema de reparación podría saturarse. La forma fosforilada de esta proteína muestra una menor eficiencia de reparación de los aductos O6-alquilguanina (Srivenugopal, 2000).

Aunque el grado de homología entre las alquiltransferasas de diferentes organismos es muy bajo, todas ellas poseen una secuencia PCHRV altamente conservada considerada como el sitio aceptor, que resulta clave en la función reparadora de la MGMT (Morgan, 1993).

2.2.2.1.3. DIOXIGENASAS DE ADN

La dioxigenasa AlkB de *E. coli* es codificada por *alkB*, un gen inducible de la respuesta adaptativa, y está implicada en la reparación de lesiones en el ADN resultantes de la alquilación producida por agentes S_N2. AlkB repara lesiones del tipo 1-metiladenina y 3-metilcitosina y de forma menos eficiente 3-metilimina y 1-metilguanina (Delaney, 2004), generadas en una hebra de cadena sencilla (Dinglay, 2000). Además de grupos metilo, AlkB puede eliminar del ADN grupos alquilo con una cadena de mayor número de átomos de carbono (hidroxietilo, propilo e hidroxipropilo) (Koivisto, 2003). Por otra parte, AlkB también ejerce su función de reparación *in vitro* sobre ARN alquilado (Ougland, 2004).

La proteína AlkB está relacionada con una familia de dioxigenasas que requieren Fe²⁺ como cofactor y 2-oxoglutarato o α-cetoglutarato como cosustrato (Aravind, 2001) y su actividad enzimática es dependiente de la presencia de O₂. En su estructura se pueden distinguir tres subdominios: un núcleo catalítico en el dominio carboxilo terminal, una región de reconocimiento de los nucleótidos y un dominio amino terminal que actúa de puente entre los dos subdominios citados anteriormente, estabilizándolos.

Se han identificado dos proteínas funcionales humanas, homólogas a AlkB de *E. coli*: ABH2 y ABH3. Reparar lesiones 1-metiladenina y 3-metilcitosina del ADN por desmetilación oxidativa. ABH3, al igual que AlkB, repara lesiones generadas sobre moléculas de ADN de cadena sencilla, mientras que ABH2 resulta más activa sobre sustratos de ADN de cadena doble; aunque también actúan sobre ARN metilado (Aas, 2003; Falnes, 2004). En cuanto a su localización celular, ABH3 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras que ABH2 está concentrada en el nucléolo, salvo cuando las células entran en fase S de su ciclo celular, que se traslada a las horquillas de replicación (Aas, 2003). Las diferencias existentes entre ABH2 y ABH3 en cuanto a sus propiedades catalíticas y su localización celular hacen pensar que puedan desempeñar papeles diferentes en la respuesta celular al daño en el ADN por agentes alquilantes. Por otra parte, a diferencia de *alkB*, los niveles de estas dos proteínas son detectables en células de mamífero y humanas y se consideran ubicuas a nivel tisular (Duncan, 2002).

2.2.2.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN

Los mecanismos de reparación del ADN por escisión se consideran entre los más importantes, tanto en procariontes como en eucariotes (Abbotts, 2014). El fundamento común de todos ellos es que una vez reconocido el daño en el ADN, se elimina en forma de bases nitrogenadas libres o de nucleótidos y el hueco resultante es rellenado con ADN sintetizado a partir de la hebra complementaria no dañada. Existen tres tipos de mecanismos de reparación por escisión que se describirán detalladamente a continuación: la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la reparación por escisión de bases (BER) y el mecanismo de reparación de apareamientos erróneos de bases del ADN (MMR).

2.2.2.2.1. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS

NER se considera una ruta de reparación muy versátil por ser capaz de eliminar una amplia variedad de lesiones del ADN estructuralmente diferentes, caracterizadas todas ellas por causar una distorsión de la doble hélice.

Muchos de los daños del ADN reparados por NER son causados por compuestos químicos que se unen covalentemente a las bases nitrogenadas

generando aductos, como el benzopireno diol-epóxido, la aflatoxina o las nitrosaminas; o que se intercalan en el ADN estableciendo dos enlaces covalentes en una misma hebra del ADN o con las dos hebras, siendo el cisplatino uno de los ejemplos más característicos. El rango de lesiones reparadas por NER también incluye a aquellas que son inducidas por la luz UV y que dan lugar a la aparición de los dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano y fotoproductos 6-4PP (van der Wees, 2007), y a algunos tipos de daño oxidativo, en concreto, especies oxidadas de tipo ciclopurinas, generadas por la formación de un segundo enlace entre una purina y la desoxirribosa constituyentes del ADN (Brooks, 2007).

Se han identificado dos vías diferentes de NER: la reparación global del genoma (GGR) y la reparación acoplada a la transcripción (TCR) (Abbotts, 2014). La primera es la responsable de la reparación de lesiones del ADN que afectan al genoma en su totalidad (regiones no codificantes del genoma, genes silenciados y genes activos que no están siendo transcritos) y la segunda repara de forma específica daños localizados en las cadenas del ADN que se están transcribiendo y que corresponden a genes activos transcripcionalmente.

El mecanismo de reconocimiento de las distorsiones generadas en el ADN es diferente en GGR y TCR. En el caso de GGR, la proteína de unión al ADN XPC no se une directamente a las bases dañadas, sino que detecta la hebra del ADN complementaria a la secuencia dañada (Maillard, 2007). XPC interactúa con HR23B y al heterodímero formado se une un tercer elemento, la centrina 2, que puede mejorar su actividad e incrementar la estabilidad del complejo (Araki, 2001). En el caso de los dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano que no generan una distorsión fuerte de la doble hélice, se requiere de la acción del complejo proteico DDB, un heterodímero constituido por DDB1 y DDB2/XPE, que se une al ADN dañado y favorece el reclutamiento de XPC y, por tanto, el reconocimiento de la lesión (Payne, 1994). En el reconocimiento del daño por TCR no interviene el complejo XPC/HR23B, sino que el bloqueo de la ARN polimerasa II sirve como señal de reconocimiento del daño en el ADN (de ahí que dicho reconocimiento esté acoplado a la transcripción) (Svejstrup, 2003); la cascada de señalización se continúa con la activación de las proteínas CSA y CSB (Hanawalt, 2008).

Una vez detectado el daño tanto por GGR como por TCR, ocurre el reclutamiento de TFIIH, un factor de transcripción de la ARN polimerasa II constituido por diferentes subunidades proteicas con distintas actividades enzimáticas, entre ellas, la actividad ATPasa de XPB y la apertura de una estructura en forma de

burbuja por parte de la helicasa XPD (Coin, 2007). A continuación, tiene lugar la incisión de la hebra de ADN dañada por parte de las endonucleasas XPF/ERCC1 y XPG que cortan en el extremo 5' y 3' respectivamente (O'Donovan, 1994; Sijbers, 1996), causando la liberación de un oligodesoxinucleótido de una longitud aproximada de 25-30 nucleótidos que contiene la lesión. Finalmente, tomando como molde el fragmento de ADN de cadena sencilla resultante al que se une RPA, el hueco es rellenado por la acción de las polimerasas δ y ϵ en asociación con PCNA (Shivji, 1992) y la mella es sellada por el complejo ADN ligasa III/XRCC1 o por la ADN ligasa I en menor medida (Moser, 2007). El mecanismo de reparación de NER no se conoce completamente y existe controversia acerca de las funciones de algunas de las proteínas que intervienen en este proceso, como es el caso de XPA y RPA.

En *E. coli*, NER está catalizada por el complejo enzimático UvrABC y la helicasa II, en ocasiones denominada UvrD. La proteína UvrA reconoce el daño del ADN y recluta a UvrB y UvrC al sitio de la lesión (DellaVecchia, 2004). UvrB rompe un enlace fosfodiéster en el extremo 3' de la región del ADN dañada (Lin, 1992), mientras que UvrC lo hace en el extremo 5' (Lin, 1992), generándose un oligonucleótido escindido de un tamaño aproximado de 12-13 bases. Seguidamente, la helicasa II elimina de la molécula de ADN de doble cadena el fragmento escindido, mediante la rotura de los puentes de hidrógeno existentes entre las bases complementarias; la ADN polimerasa I rellena el hueco generado y la ADN ligasa lo sella (Caron, 1985).

En el caso de los humanos, existen numerosas enfermedades asociadas a deficiencias en NER, derivadas en muchos casos de mutaciones en los genes implicados en este sistema de reparación del ADN. Las más destacadas son la xerodermia pigmentosa, el síndrome de Cockayne, el síndrome cerebro-óculo-facio-esquelético, el síndrome de sensibilidad a UV y la tricotiodistrofia (Nouspikel, 2009).

2.2.2.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

BER repara, de manera general, lesiones del ADN que no causan una distorsión en su estructura (Wyatt, 2013); escinde y reemplaza bases incorporadas de manera incorrecta, como el uracilo, o bases dañadas por desaminación, alquilación u oxidación.

El mecanismo de reparación se inicia con la acción de una ADN glicosilasa que reconoce de manera específica una base del ADN alterada, la acomoda sobre su sitio catalítico y la libera hidrolizando el puente N-glicosídico que une la base nitrogenada con la desoxirribosa (Krokan, 1997). Como consecuencia, se generan “sitios abásicos” (sitios AP), que en función de la naturaleza de la base escindida se denominan apurínicos o apirimidínicos y que se caracterizan por ser citotóxicos y mutagénicos.

Existen diferentes ADN glicosilasas que se distinguen por su especificidad de sustrato y además, se clasifican en monofuncionales y bifuncionales, si solo tienen actividad de escisión de bases o si además cuentan con actividad AP-liasa, respectivamente; por lo general, son proteínas monoméricas que no requieren cofactores. En *E. coli* se han descrito tres ADN glicosilasas: Fpg o MutM, Nei y Nth, encargadas de la reparación de bases oxidadas y en humanos al menos se han descrito diez (Dizdaroglu, 2012; Visnes, 2009):

- UNG, TDG, SMUG-1 y MBD4 pertenecientes a la superfamilia de ADN glicosilasas de uracilo. Catalizan la retirada de residuos de uracilo del ADN de cadena sencilla y de cadena doble cuando están posicionados frente a G, A y CpG. La presencia de bases de uracilo en el ADN es una lesión habitual que puede producirse por desaminación hidrolítica de la citosina o incorporarse de forma errónea en el proceso de replicación (Sousa, 2007).
- AAG/MPG repara un rango amplio de bases alquiladas, como por ejemplo, la 3-metiladenina, que es considerada una de las más citotóxicas.
- ADN glicosilasas que reparan bases oxidadas: MYH cataliza la escisión de A enfrentada a G (8-oxoG); OGG1, NTH1 y la familia NEIL, constituida por tres enzimas, se encargan de la reparación de pirimidinas oxidadas.

El siguiente paso en BER es la incisión del sitio AP por la acción de una endonucleasa de sitios abásicos (APE) que rompe el enlace 5'-fosfodiéster respecto a la lesión generando una rotura del ADN de cadena sencilla con residuos 3'-hidroxilo y 5'-desoxirribosafosfato en ambos extremos (Mol, 2000). La incisión del sitio AP también puede generarse por la actividad AP-liasa de algunas ADN glicosilasas que les permite hidrolizar el enlace 3'-fosfodiéster dando lugar igualmente a una rotura en la cadena del ADN (Bebenek, 2001; Garcia-Diaz, 2001).

A partir de este punto, la reparación del daño en el ADN por BER puede completarse a través de dos procedimientos: “short-patch BER” y “long-patch BER”.

El primero de ellos se inicia con la eliminación de los residuos de ambos extremos de la rotura; por ejemplo, la actividad liasa de la ADN polimerasa β (POLB) permite la liberación de los residuos 5'-desoxirribosa fosfato (5'-dRP) de los sitios AP (Matsumoto, 1995). A través de su actividad polimerasa, la ADN polimerasa β inserta un único nucleótido que es sellado sobre el esqueleto del ADN por acción de la ADN ligasa III α que forma un complejo con XRCC1 (Cappelli, 1997; Fortini, 1998). Cuando los 5'-dRP de los sitios AP ofrecen resistencia al corte por la actividad AP-liasa de POLB, la reparación del ADN se completa por el procedimiento "long-patch BER". En este caso intervienen las polimerasas ϵ (POLE) y δ (POLD), que pueden añadir hasta 10 nucleótidos en el hueco del ADN dando lugar a una estructura "flap desoxirribosa fosfato" (5'dRPflap) que es reconocida y eliminada por la endonucleasa-1 flap (FEN1) asociada al PCNA y el corte es sellado por acción de la ADN ligasa I (Stucki, 1998).

Según lo descrito, en el proceso de reparación por BER se distinguen diferentes pasos que están altamente coordinados, aunque en cada uno de ellos intervenga una enzima o conjunto de enzimas específicas. La proteína XRCC1 es clave en este mecanismo de reparación, ya que coordina los diferentes pasos del procesamiento del ADN interaccionando con las enzimas implicadas y asegurando de esta manera una reparación completa del material genético (Fu, 2012). Otra proteína importante implicada en BER es PARP-1 que se une a los sitios AP permitiendo el acceso a las proteínas que intervienen en su reparación, como POLB y XRCC1 (Swindall, 2013).

En *E. coli*, también se distingue una ruta "short-patch BER" y "long-patch BER", en la primera Pol I se encarga de la síntesis del ADN, mientras que en la segunda, a través de su actividad exonucleasa 5'-3', libera los residuos 5'-dRP. En ambas rutas, participa Lig I sellando los cortes en el paso final de la reparación.

2.2.2.2.3. REPARACIÓN DE APAREAMIENTOS ERRÓNEOS DE BASES

MMR corrige errores derivados del proceso de replicación del ADN basados en la existencia de nucleótidos no dañados que se encuentran mal apareados y también reconoce nucleótidos que no están apareados debido a inserciones y deleciones que han ocurrido en la secuencia del ADN. En términos generales, el proceso de reparación comprende un primer paso de reconocimiento del error en el

apareamiento de bases e identificación de la base que ha sido incorporada de forma incorrecta, su escisión y la síntesis de ADN.

La ruta de reparación MMR prototipo en *E. coli* ha sido ampliamente estudiada. Se inicia con el reconocimiento y la unión de MutS en forma de homodímero a bases mal apareadas y a nucleótidos sin aparear (Obmolova, 2000). Seguidamente, tiene lugar el ensamblaje del complejo de reparación funcional constituido por MutS, MutL y MutH. La identificación de la hebra del ADN que lleva incorporada la base errónea se hace en base al grado de metilación del ácido nucleico; así, la hebra hija recién sintetizada en el proceso de replicación va a estar transitoriamente desmetilada en comparación con la hebra parental. La proteína MutH, que pertenece a la familia de las endonucleasas de restricción de tipo II, actúa en forma de monómero reconociendo secuencias dGATC hemimetiladas en la hebra que precisa la reparación y las corta en uno de sus extremos en función de la localización de la base mal apareada (Lee, 2005). La helicasa II UvrD desenrolla la doble hélice en dirección a la lesión a partir de la mella generada. Una exonucleasa degrada la hebra del ADN que contiene la base errónea en el sentido adecuado (Dao, 1998), mientras que al ADN de cadena sencilla originado en la reparación se unen proteínas SSB para protegerlo de la acción de las nucleasas. Finalmente, la ADN polimerasa III sintetiza el ADN para rellenar el hueco resultante que es sellado por la acción de la ADN ligasa (Modrich, 1996).

MMR se mantiene altamente conservada y en el caso de los humanos presenta gran similitud con el mecanismo de reparación descrito en *E. coli*, en cuanto a la especificidad de sustrato, la bidireccionalidad del proceso de reparación y la especificidad de hebra en la que tiene lugar el corte. En el inicio del proceso de reparación intervienen las proteínas MSH2, MSH3 y MSH6 que forman los heterodímeros MSH2-MSH6 o MSH2-MSH3, homólogos de MutS. MSH2-MSH6 reconoce un apareamiento erróneo de bases mientras que MSH2-MSH3 reconoce desapareamientos de 1-2 nucleótidos (Li, 2008). Se han identificado cuatro proteínas homólogas de MutL: MLH1, MLH3, PMS1 y PMS2. MLH1 puede heterodimerizar con cualquiera de las otras tres; el heterodímero MLH1-PMS2 regula la escisión de la cadena del ADN que contiene el error (Kunkel, 2005). PCNA interacciona con MSH2 y MLH1 para iniciar los pasos de síntesis *de novo* del ADN en los que interviene la exonucleasa 1 con actividad catalítica en dirección 5'-3', que lleva a cabo escisión dirigida hacia el extremo 5' y también está implicada en la MMR en dirección 3' donde se requiere de la actividad nucleasa del MLH1-PMS2 (Gu, 1998; Schmutte,

1998). Finalmente, intervienen POLD, que efectúa la síntesis de ADN y la ADN ligasa I (Longley, 1997). Otras proteínas involucradas en los últimos pasos de MMR son RPA y RFC que se unen a regiones de ADN de cadena sencilla.

2.2.2.3. REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA

Existen dos tipos de mecanismos de reparación de las roturas de doble cadena, independientes, pero no mutuamente excluyentes: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR) (Bassing, 2004). En general, las roturas de doble cadena producidas por radiaciones ionizantes son reparadas por NHEJ, y las que dan lugar a colapsos en el proceso de replicación, se reparan por HR (Rothstein, 2000).

2.2.2.3.1. UNIÓN DE EXTREMOS NO HOMÓLOGOS

NHEJ es un mecanismo de reparación del ADN predominante en organismos eucariotas superiores. Los extremos originados tras la ruptura del ADN son directamente ligados sin usar una secuencia homóloga como molde; por ello, es calificado como un sistema de reparación “propenso a error”. Cuando en los extremos de la rotura existen salientes de ADN denominados microhomologías, NHEJ utiliza estas secuencias cortas como guías en su reparación.

El procedimiento de reparación del ADN por NHEJ se inicia con la acción del heterodímero Ku 70/80 que reconoce una rotura de doble cadena, se une a la región dañada y recluta a la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente del ADN (ADN-PKcs) para que proteja los extremos del ADN de actividades exonucleasas (Rivera-Calzada, 2007). A continuación, estos extremos rotos son procesados según su complejidad por acción de diferentes factores como Artemis, la polinucleótido quinasa 3'-fosfatasa (PNKP), la ADN polimerasa o el complejo MRN; y, una vez unidos, la ADN-PKc se autofosforila para disociarse de la rotura de doble cadena y activar a otras proteínas (Burma, 2004). El proceso de reparación se completa por la ligación efectuada por la ADN ligasa IV formando un complejo con el cofactor XRCC4, que es estimulada por XLF (Shrivastav, 2008).

2.2.2.3.2. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La reparación por HR promueve un intercambio de información genética entre moléculas de ADN y su mecanismo molecular ha sido ampliamente caracterizado en el contexto de la reparación de roturas en el ADN. Se trata de un mecanismo de reparación seguro, pues a diferencia de NHEJ utiliza como molde un ADN completamente homólogo. Dentro del genoma, se consideran secuencias homólogas a las cromátidas hermanas, cromosomas homólogos o regiones repetidas localizadas en un mismo cromosoma o en diferentes.

El mecanismo de reparación por HR en humanos se inicia con el procesamiento de los extremos rotos en dirección 5'-3' por el complejo MRN regulado por BRCA1 y otras exonucleasas. A los extremos monocatenarios 3' resultantes se une RPA, que es fosforilado y reemplazado por RAD51, en una reacción mediada por RAD52 y BCRA2 (Krogh, 2004). El filamento nucleoproteico formado busca e invade una secuencia homóloga. RAD51 se disocia de la hebra de cadena sencilla y tiene lugar el apareamiento de bases entre la cadena invasora y la cadena donadora y la posterior extensión llevada a cabo por la ADN polimerasa. Una vez finalizada la síntesis del ADN, los huecos de cadena sencilla resultante y las mellas son reparados por la ADN polimerasa y la ADN ligasa (Summers, 2011).

El procedimiento de reparación por HR ocurre en todas las células eucariotas y se han descrito proteínas homólogas a las humanas en diferentes organismos, como *Sacharomyces cerevisiae*. La proteína de mamíferos Rad51 es homóloga a la proteína RecA de *E. coli* que actúa como activador de la respuesta SOS cuyo funcionamiento se describe en el siguiente apartado.

2.2.2.3.3. RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN

Los organismos eucariotas han desarrollado una respuesta al daño en el ADN (DDR) que engloba el reconocimiento del daño, la transducción de la señal a un conjunto de rutas celulares diferentes que incluyen la reparación del ADN, los puntos de control o sistemas de vigilancia del ciclo celular, la respuesta transcripcional y la apoptosis. Tanto NHEJ como HR son rutas de reparación iniciadas por DDR.

En general, DDR consiste en dos rutas paralelas que responden a lesiones del ADN diferentes y que están interconectadas; las cascadas de señalización en

cada una de ellas son iniciadas por una fosfatidilinositol-3-quinasa: ATM (ataxia-telangiectasia mutada) y ATR (ATM relacionada con Rad3), que participan en el reconocimiento de la lesión del ADN junto con otras proteínas como RPA y en la transducción de la señal a través de la fosforilación y activación de otras proteínas (BRIT1, BRCA1, MRN, CHK1...) implicadas en las rutas con el fin de conseguir una regulación de los sistemas efectores (Abraham, 2001; Shiloh, 2003).

2.2.2.4. RESPUESTA SOS

La respuesta SOS es un sistema de reparación del ADN bacteriano que se induce ante situaciones de estrés por genotoxicidad e implica la activación de un conjunto de genes (genes SOS) (Michel, 2005) que forman parte de un regulón (Schlachter, 2006). Se trata de un sistema de reparación común a todas las bacterias, aunque existe cierta divergencia entre los genes de distintas especies (Mazon, 2004). Entre los genes SOS se encuentran aquellos cuyos productos de expresión participan en BER, NER o en la reparación por recombinación, en la división celular y también codifican para diferentes polimerasas.

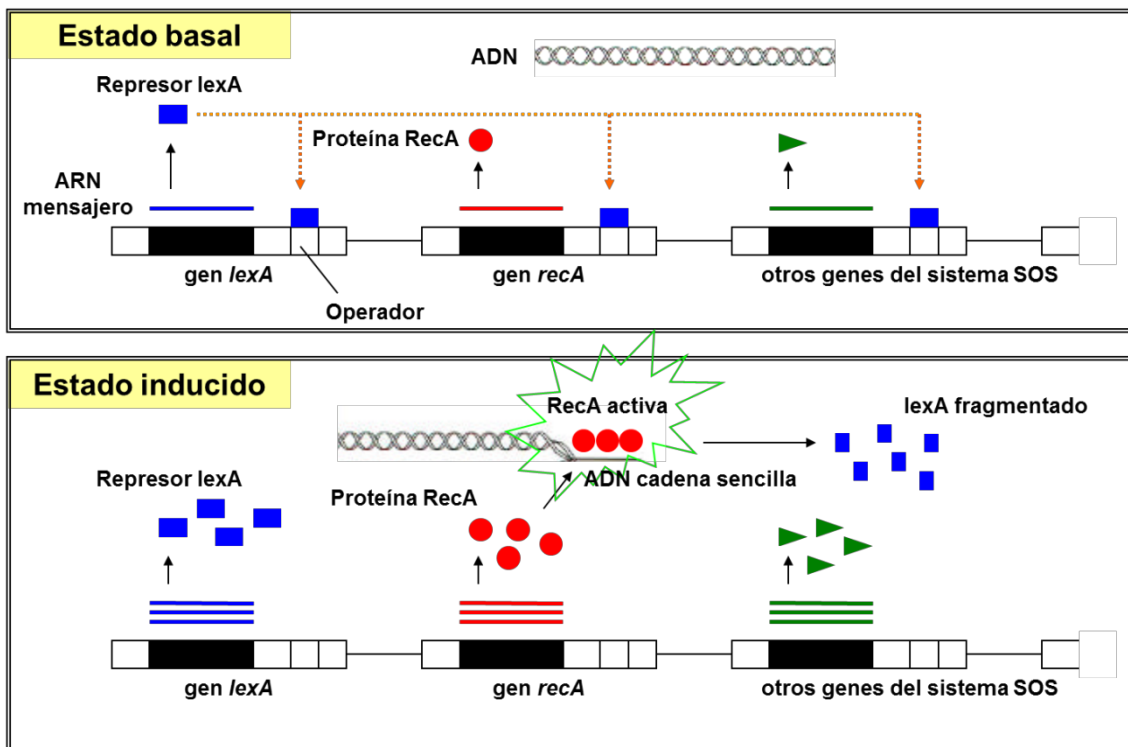


Figura I-2. Regulación del sistema SOS.

La regulación del sistema SOS bacteriano está basada fundamentalmente en la interacción entre la proteína LexA que actúa como represor y la proteína RecA que funciona como inductor (Little, 1982).

LexA ejerce su actividad represora en forma de dímero (Thliveris, 1991), el cual reconoce una secuencia consenso de aproximadamente 20 pb denominada “caja SOS” presente en el sitio operador de los genes pertenecientes al sistema SOS (Lewis, 1994). La unión de LexA a la “caja SOS” bloquea la transcripción génica al impedir que la ARN polimerasa se una a ella (Serment-Guerrero, 2005). La proteína LexA cuenta con un dominio amino-terminal de unión al ADN y otro carboxi-terminal responsable de la dimerización de LexA y de su actividad autoproteolítica. Esta última es activada por interacción de LexA con filamentos RecA-ADN de cadena sencilla (Zhang, 2010).

Como se muestra en la figura I-2, el represor LexA, en condiciones normales de crecimiento bacteriano, reprime la expresión de los genes SOS mediante su unión a la “caja SOS” (Michel, 2005). El grado de represión depende de la secuencia exacta de la “caja SOS”, de su posición respecto al promotor y de la longitud de este último (Michel, 2005). Cuando se produce daño en el material genético y se origina ADN de cadena sencilla, la proteína RecA se une al mismo y pasa a un estado activo donde funciona como coproteasa al promover la autodegradación de LexA por la ruptura del enlace peptídico Ala-84–Gly-85 que se localiza en la mitad de la proteína (Horii, 1981; Janion, 2008); de esta manera, se induce la respuesta SOS. LexA en ese estado es incapaz de unirse al promotor de los genes SOS, incrementándose su expresión (Figura I-2).

La proteína RecA, por su parte, tiene un peso molecular de 38 kDa y desempeña sus dos funciones principales, la recombinación homóloga y la reparación del ADN mediante la inducción de la respuesta SOS (Schlacher, 2006), a partir de la formación de un nucleofilamento ADN-RecA. Tiene una fuerte tendencia a formar filamentos nucleoproteicos con ADN de cadena sencilla y en menor medida con ADN de doble cadena (Arenson, 1999). El ensamblaje de RecA con ADN de cadena sencilla requiere de la presencia de dATP o ATP, pero no de actividad ATPasa; el desensamblaje, por su parte, requiere de la hidrólisis del ATP a ADP y ocurre con mayor lentitud (Janion, 2008). La formación de este nucleofilamento está regulada por la acción de RecBCD, que une RecA al ADN de cadena sencilla (Churchill, 1999); RecFOR, que facilita dicha unión (McPartland, 1980); las proteínas de unión al ADN SSB, que promueven su fase de extensión en dirección 5´-3´ una vez que RecA se ha

unido (Kowalczykowski, 1994) y DinI, en presencia del cual, se procede al ensamblaje y bloquea el desensamblaje (Lusetti, 2004).

La regulación de la respuesta SOS ocurre de una manera secuencial en tiempo, habiendo proteínas que se expresan más pronto o más tarde con respecto a la detección del daño en el ADN. Algunos autores proponen un índice de heterología de las secuencias de las “cajas SOS” con respecto a la secuencia consenso como indicativo del grado de afinidad de LexA con la “caja SOS” de cada gen del sistema (Lewis, 1994). Así, en función de la mayor o menor afinidad de LexA por un determinado operador de un promotor, la inducción de ese gen será más tardía o más temprana, respectivamente. De igual manera, en condiciones normales de crecimiento bacteriano, los genes SOS están reprimidos en diferente grado; por lo que su expresión basal en algunos casos es alta (Schnarr, 1991). Entre los genes de expresión temprana se encuentran *lexA*, los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrD* implicados en NER, genes encargados de la reparación del ADN por recombinación, *pol B* y *dinB* que codifican para las polimerasas II y IV respectivamente, *dinI*, *recA* y *recN*; y en las últimas etapas de la inducción, el inhibidor de la división celular *sfiA* y los genes *umuC* y *umuD*, que codifican para la polimerasa V (Kuzminov, 1999).

La polimerasa V (UmuD₂C) es activada por RecA para catalizar la síntesis translesión del ADN con la intención de reparar el daño en el mismo, pero su baja eficacia de actuación da lugar a la mutagénesis derivada de la respuesta SOS (Schlacher, 2005). DinI en presencia del nucleofilamento ADN-RecA inhibe la activación de la polimerasa V (Yasuda, 2001).

La inducción de la respuesta SOS está sincronizada con la reparación del daño del ADN. Existe un nivel de regulación adicional a la represión por LexA, que parece estar gobernado por UmuC y UmuD (Opperman, 1999). Los resultados obtenidos en diferentes trabajos de investigación demuestran que la expresión de los genes SOS no es inducida hasta completarse la reparación del daño; sino que su inducción tiene lugar en forma de pulsos de activación de una amplitud determinada que se repiten en mayor o menor medida según el nivel de daño existente en el ADN (Friedman, 2005).

2.2.3. ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD

Los ensayos de genotoxicidad son diseñados con la finalidad de detectar agentes que inducen de manera directa o indirecta algún tipo de daño en el material

genético; y, por ello, puedan generar una posible actividad mutagénica y/o carcinogénica; aunque es importante remarcar que no todos los genotóxicos son mutágenos ni carcinogénicos, es decir, sustancias capaces de incrementar la tasa de mutación y de aparición de un tumor, respectivamente.

La actividad humana ha provocado que muchas sustancias genotóxicas alcancen el medio ambiente y que los seres vivos, incluido el ser humano, se encuentren expuestos a este tipo de compuestos que incluso a bajas concentraciones pueden producir efectos adversos. Esto, junto con el desarrollo de nuevos compuestos químicos con aplicación farmacológica, ha creado la necesidad de monitorizar y evaluar el potencial genotóxico de diferentes compuestos químicos y/o mezclas complejas mediante ensayos que permitan valorar la genotoxicidad de manera rápida y simple.

Por ello, durante las últimas décadas se han diseñado test con organismos tanto *in vitro* como *in vivo*, de complejidad variable, basados en el análisis de un determinado mecanismo biológico que va a permitir llevar a cabo una evaluación de la genotoxicidad. Algunos de los factores a tener en cuenta para seleccionar un ensayo apropiado son: el tipo de daño genético a valorar, la capacidad metabólica del sistema de ensayo, la aplicación del agente a valorar, el valor predictivo del ensayo en términos de mutagenicidad y carcinogenicidad y los requerimientos legislativos.

Los diferentes ensayos de genotoxicidad pueden clasificarse atendiendo a varios criterios, pero en este apartado nos limitaremos a describir los más destacados por su uso y aplicaciones:

- **Test de Ames**

Es un ensayo de reversión o retromutación, en el que se evalúa la generación de mutaciones inversas que suprimen el efecto de una mutación original sobre un rasgo fenotípico claramente observable. De manera más concreta, se trata de un ensayo *in vitro* en el que se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium* auxótrofas para la histidina que son expuestas a sustancias cuyo potencial mutagénico se quiere valorar y, mediante el recuento de colonias en un medio carente de histidina, se evalúa la reversión a la prototrofia como consecuencia de una alteración genética causada por el agente mutagénico (Ames, 1975). Se trata de la prueba más usada para valorar, de forma simple y económica, el poder mutagénico de diversas sustancias.

- **Ensayo Cometa**

Es un ensayo *in vitro* que permite detectar el efecto genotóxico inducido por un determinado agente sobre las células de un ser vivo a partir una electroforesis en gel de agarosa, en la que se analiza el patrón de migración del ADN celular por fluorescencia o por tinción del mismo (Ostling, 1984; Singh, 1988). Las células que han experimentado un incremento de daño en su ADN dan lugar a un patrón de migración con la apariencia de un cometa, en el que se puede distinguir una cabeza que corresponde con la fracción nuclear y una cola formada por los fragmentos del ADN que presentan una mayor migración hacia el ánodo. Se trata de un método sensible y rápido.

- **“SOS chromotest”**

Se trata de un ensayo colorimétrico *in vitro* en el que se usa un biosensor microbiano formado por bacterias *E. coli* modificadas genéticamente con la construcción genética resultante de la fusión del gen *sfiA*, que forma parte de la respuesta SOS, y *lacZ*, que codifica para la β -galactosidasa (Quillardet, 1982). El biosensor microbiano se expone a diferentes concentraciones de un agente o muestra problema y tras un tiempo de incubación se analiza la señal colorimétrica generada por la β -galactosidasa, cuya expresión es dependiente de la inducción de la respuesta SOS, en concreto, del gen *sfiA*.

- **Ensayo de aberraciones cromosómicas en mamíferos**

Este ensayo tiene por objetivo detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo, debidas a roturas y reordenaciones dentro de un cromosoma o entre cromosomas diferentes. Estas reorganizaciones pueden ser producidas por sustancias que rompen directamente la cadena de ADN o que distorsionan la doble hélice de ADN.

Para llevar a cabo este tipo de ensayo se exponen los cultivos celulares al compuesto a evaluar, con y sin activación metabólica, y se tratan a intervalos preestablecidos con una sustancia que detenga la división celular en metafase. Las células se recolectan, se tiñen y se observan al microscopio para detectar la presencia de aberraciones cromosómicas en aquellas que se encuentren en metafase (OECD, 2013).

- **Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos**

Es una prueba *in vivo* que tiene por objeto detectar agentes que ocasionan lesiones citogenéticas (rupturas cromosómicas o cromatídicas, pérdidas de cromosomas enteros) y dan lugar a la formación de micronúcleos. Estos son fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros generados espontáneamente o por acción de un agente externo, que van a quedar fuera del núcleo durante la mitosis (Schmid, 1975).

El ensayo se basa en exponer a animales a la sustancia cuyo efecto genotóxico se quiere valorar eligiendo una vía adecuada. A intervalos apropiados tras el tratamiento, se extrae sangre periférica o la médula ósea, se hacen preparaciones celulares en portaobjetos y se tiñen para poder visualizarlas al microscopio y analizar la presencia de micronúcleos (OECD, 2013).

2.3. QUIMIORRESISTENCIA DEL CÁNCER DE HÍGADO

Los tumores hepáticos constituyen el quinto tipo de cáncer más frecuente y son la tercera causa de muerte por cáncer (Venook, 2010). Se pueden clasificar según su origen en primarios, derivados de células hepáticas; y secundarios, debidos a metástasis de tumores originados en otros tejidos, frecuentemente tumores colorrectales (Benson, 2007). Atendiendo a la gravedad del pronóstico, se pueden clasificar en benignos, como el hemangioma, adenoma colangiocelular, cistadenoma biliar, adenoma hepatocelular y hemangioendotelioma infantil, entre otros; y malignos, como el carcinoma hepatocelular (HCC), hepatoblastoma (HB) y colangiocarcinoma (CGC).

2.3.1. TRATAMIENTOS DISPONIBLES

La elección del tratamiento del cáncer hepático está determinada por el estadio del tumor en el momento que es diagnosticado, ya que la respuesta tumoral varía en función de la fase en la que se encuentre. Desafortunadamente, este tipo de tumores suelen diagnosticarse en un estado avanzado y los pacientes suelen presentar deterioro hepático, debido a que se asientan sobre una cirrosis, sobre todo en el caso del carcinoma hepatocelular (HCC), o debido a la edad avanzada y la existencia de otras patologías. En esta situación, el abanico de opciones terapéuticas se reduce y el pronóstico empeora.

La resección hepática es la opción curativa principal cuando el tumor se detecta en una etapa temprana en la que se preserva la función hepática (de Lope, 2012). En el mismo sentido, el trasplante hepático está aconsejado en pacientes con un tumor diagnosticado en una fase temprana y cirrosis (Forner, 2012). Sin embargo, en etapas avanzadas del tumor se descarta la intervención quirúrgica.

Otras opciones curativas en el tratamiento de pacientes diagnosticados en un estadio temprano o intermedio son la ablación por radiofrecuencia (que está reemplazando a la inyección percutánea de etanol en el tumor) y la quimioembolización transarterial (Miyahara, 2014).

Entre los tratamientos paliativos se encuentran la radioembolización, la quimioterapia, la inmunoterapia, la terapia hormonal y la terapia génica (de Lope, 2012).

Aunque existe una gran variedad de fármacos antineoplásicos disponibles en la actualidad, los tumores hepáticos se encuentran entre los que presentan una mayor refractariedad al tratamiento farmacológico (Marin, 2010). Entre los fármacos mejor estudiados frente al cáncer de hígado están el 5-fluorouracilo (5-FU), la gemcitabina y la doxorrubicina, pero sus beneficios en lo relativo al aumento de supervivencia no son relevantes (Llovet, 2003). Las combinaciones de fármacos que incluyen cisplatino, oxaliplatino, docetaxel, paclitaxel, mitomicina C, doxorrubicina, epirubicina, lomustina o interferón α tampoco han mostrado beneficios claros (Marin, 2010). Actualmente, el tratamiento de elección es el sorafenib, un inhibidor multiquinasa que tiene un efecto positivo en la supervivencia del paciente (Llovet, 2008).

2.3.2. LIMITACIONES DE LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL ACTUAL

2.3.2.1. INESPECIFICIDAD

Una de las limitaciones existentes en el tratamiento del cáncer es la inespecificidad de la mayoría de los fármacos empleados, puesto que estos pueden afectar también a las células sanas (Zhukov, 2008). En general, su efecto selectivo se basa en el hecho de que las células tumorales crecen más rápidamente que las normales. Sin embargo, ciertos tipos celulares de la médula ósea y el epitelio intestinal, con rápido recambio, pueden verse gravemente afectados.

2.3.2.2. TOXICIDAD

El margen terapéutico de la mayoría de los fármacos antitumorales es estrecho, de manera que las dosis a las que producen efectos terapéuticos beneficiosos y las que producen toxicidad están muy próximas (Zhukov, 2008). Algunos de los efectos tóxicos más frecuentes son las reacciones de hipersensibilidad, la toxicidad sobre los órganos encargados de su destoxificación como el hígado y el riñón, y la neuro y mielotoxicidad. Además, la genotoxicidad de los propios fármacos puede originar otras formas severas de toxicidad, como son la mutagenicidad y la carcinogenicidad (Suspiro, 2011).

2.3.2.3. RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA

La refractariedad de los tumores a los fármacos y el desarrollo de resistencia durante el tratamiento es un problema común en clínica y constituye uno de los principales obstáculos que comprometen el éxito de los tratamientos quimioterápicos (Marin, 2009). Cuando un tumor se encuentra sometido a un tratamiento farmacológico, las células sensibles son destruidas, pero la subpoblación de mutantes que se van transformando en resistentes sobrevive y prolifera.

En lo que se refiere al cáncer de hígado, se encuentra entre los tumores con menor sensibilidad a la quimioterapia (Marin, 2010). La razón de este fracaso es que presenta una elevada resistencia natural como característica fenotípica, que se acentúa al someter a las células tumorales a la presión que supone el tratamiento farmacológico (Marin, 2010). Los mecanismos implicados en la quimiorresistencia (MOC, de “mechanisms of chemoresistance”) son diversos y pueden actuar de forma conjunta generando el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR, de “multidrug resistance”) que caracteriza a muchos tipos de cáncer, no sólo al cáncer hepático.

2.3.3. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA

La resistencia a la quimioterapia tiene un origen multifactorial (Figura I-3). En un intento de facilitar su estudio, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo recientemente un trabajo donde se han clasificado los MOC en varios grupos (Marin, 2010):

- Disminución de la captación del fármaco (MOC-1a).
- Aumento del eflujo del fármaco (MOC-1b).
- Falta de activación de profármacos o mayor inactivación del fármaco (MOC-2).
- Cambios en la diana del fármaco (MOC-3).
- Mayor reparación del daño en el ADN causado por agentes antitumorales (MOC-4).
- Resistencia a la activación de la apoptosis (MOC-5a).
- Mayor actividad de factores antiapoptóticos y de vías de supervivencia (MOC-5b).

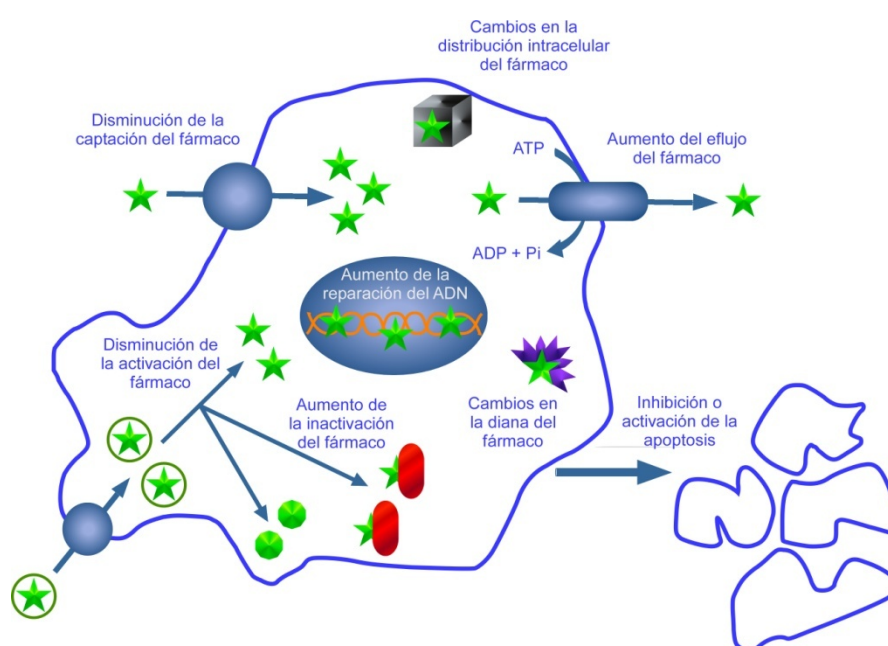


Figura I-3. Mecanismos de resistencia a la quimioterapia antitumoral.

2.3.3.1. PAPEL DEL TRANSPORTOMA EN QUIMIORRESISTENCIA TUMORAL

El concepto de transportoma se refiere al conjunto de genes relacionados con el transporte de fármacos cuyo perfil de expresión puede predecir la respuesta a un tratamiento antitumoral (Huang, 2004). En los últimos años, se ha descrito un papel relevante en la resistencia a fármacos para muchos miembros de las familias de transportadores SLC ("solute carrier") y ABC ("ATP-binding cassette"). La familia SLC engloba un conjunto de proteínas que transportan sustratos muy diversos, desde moléculas orgánicas hasta iones inorgánicos. También son capaces de mediar la

captación de fármacos derivados de dichos sustratos naturales. La familia de proteínas ABC está formada por bombas de extrusión.

La concentración que el fármaco alcanza dentro de las células está determinada por el balance entre captación y eflujo, y constituye un punto clave en la eficacia de la terapia antitumoral. La mayoría de compuestos, salvo los fármacos con mayor carácter lipofílico que pueden acceder a los tejidos por difusión simple, requieren de transportadores expresados en la membrana plasmática (Chandra, 2004). Por tanto, una reducción en la expresión de los transportadores implicados en la captación de fármacos citostáticos, clasificado como MOC-1a, se traduciría en una disminución del efecto terapéutico (Marin, 2010). El eflujo del fármaco por bombas exportadoras pertenecientes al MOC-1b también está implicado en la reducción de la concentración intracelular del fármaco.

En la Figura I-4 se muestran los principales transportadores SLC y ABC presentes en los hepatocitos, implicados en MOC-1a (proteínas SLC) y MOC-1b (bombas ABC).

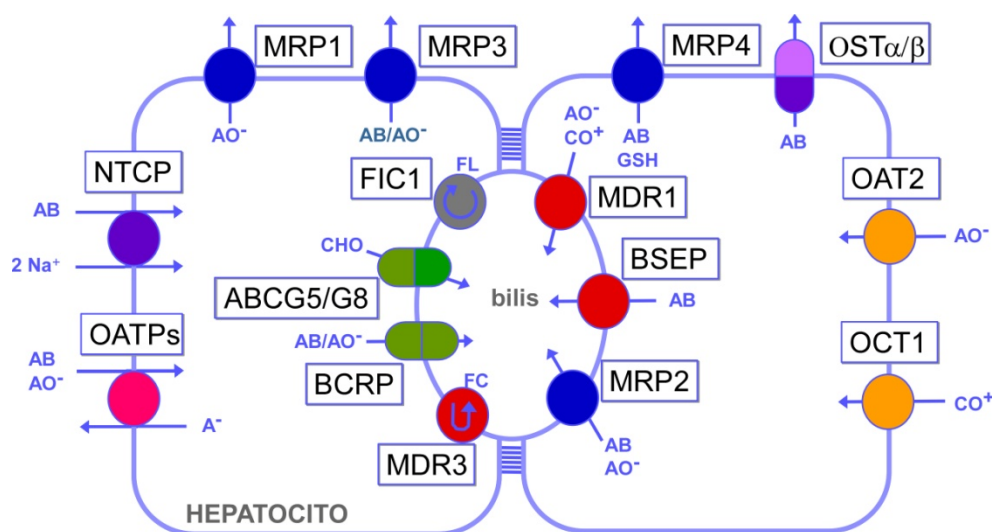


Figura I-4. Representación esquemática de los principales sistemas de transporte implicados en la captación y secreción de compuestos endógenos colefílicos y fármacos en los hepatocitos. AB, ácidos biliares; AO⁻, aniones orgánicos; CO⁺, cationes orgánicos; CHO, colesterol; GSH, glutatión reducido; FC, fosfatidilcolina; FL, fosfolípidos.

2.3.3.1.1. DISMINUCIÓN DE LA CAPTACIÓN DEL FÁRMACO (MOC-1a)

Las proteínas SLC que se encuentran expresadas en células tumorales derivadas de tejido hepático, pueden determinar las concentraciones intracelulares de determinados compuestos y, por tanto, su actividad antitumoral (Okabe, 2008). En este sentido, hay que tener en cuenta que, aparte de las diferencias de expresión, la existencia de polimorfismos también determina grandes diferencias interindividuales en la captación de fármacos (Marin, 2012). Además, la expresión de estas proteínas en los tejidos neoplásicos puede cambiar durante el desarrollo tumoral y particularmente en respuesta a la quimioterapia.

Los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), que están codificados por los genes *SLCO*, pueden transportar gran cantidad de sustratos endógenos y xenobióticos, incluyendo fármacos citostáticos (Hagenbuch, 2004).

El OATP1B1 y el OATP1B3, codificados por los genes *SLCO1B1* y *SLCO1B3* respectivamente, son capaces de transportar fármacos antitumorales como flavopiridol, metotrexato, paclitaxel, irinotecán e inhibidores de tirosina quinasa (Buxhofer-Ausch, 2013), y conjugados de cisplatino y ácidos biliares (Marin, 2010). Una reducción de la expresión de OATP1B1 y de OATP1B3 o de su funcionalidad podría resultar en una menor acumulación de los fármacos en las células tumorales (Zollner, 2005). De hecho, se ha descrito la disminución de la expresión de estas proteínas en HCC y colangiocarcinoma (CGC) (Martinez-Becerra, 2012). Cambios en la expresión y funcionalidad del OATP1A2 (*SLCO1A2*) también se han relacionado con el desarrollo de resistencia al metotrexato (Badagnani, 2006) y al imatinib (Yamakawa, 2011).

La disminución de la expresión del OATP1B1 en cáncer de hígado se acompaña de la pérdida del NTCP, el principal sistema de captación de ácidos biliares en los hepatocitos. Este transportador también parece estar involucrado en la captación de derivados citostáticos de cisplatino y ácidos biliares (Briz, 2002).

Las familias SLC28 y SLC29 incluyen los transportadores concentrativos de nucleósidos de alta afinidad (CNT) y los de baja afinidad o también llamados equilibrativos (ENT). Ambos juegan un papel clave en la captación de diferentes agentes antitumorales con estructura nucleosídica (Pastor-Anglada, 2004). La expresión de CNTs y ENTs puede determinar la sensibilidad de distintos tipos de tumores a estos fármacos (Pastor-Anglada, 2004).

El CTR1 (*SLC31A1*) constituye el principal mecanismo de captación de cobre. Se ha demostrado que este transportador participa, además, en la captación de cisplatino, por lo que se relaciona la expresión de esta proteína con la aparición de resistencia a dicho fármaco citostático (Holzer, 2004).

La potencialidad del tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa depende de su capacidad de alcanzar sus dianas intracelulares. Esto puede estar significativamente afectado por ciertos transportadores de membrana. El imatinib y el sorafenib son captados por el OCT1 (*SLC22A1*), lo que sugiere que la eficacia de los inhibidores de tirosina quinasa puede estar relacionada con la actividad de este transportador (Herraez, 2013).

2.3.3.1.2. AUMENTO DEL EFLUJO DEL FÁRMACO (MOC-1b)

La mayoría de los genes implicados en este MOC codifican bombas exportadoras que pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC. La sobreexpresión de algunos miembros de esta familia de proteínas en células tumorales constituye uno de los principales obstáculos de la terapia antitumoral (Marin, 2010); en algunos casos, puede deberse a la resistencia celular adquirida como respuesta a la exposición a compuestos con acción farmacológica que, incluso, pueden no ser sustratos, resultando en un fenotipo MDR (Marin, 2009).

Se han caracterizado más de 48 genes *ABC* en humanos, que pueden clasificarse en siete subfamilias basándose en sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (Dean, 2005). Son proteínas integrales de membrana capaces de translocar a través de las membranas celulares una gran variedad de sustancias endógenas como azúcares, aminoácidos, metales, péptidos y proteínas, así como un gran número de compuestos exógenos, incluyendo fármacos antitumorales; utilizando la energía de la hidrólisis del ATP. Dependiendo de su localización en la membrana plasmática de los hepatocitos (Figura I-4), los transportadores ABC son responsables del eflujo de compuestos a la bilis si se localizan en la membrana canalicular y de la expulsión de los compuestos a la sangre cuando se ubican en la membrana basolateral. Dentro de los primeros destacan varios miembros de las subfamilias de genes *ABCB*, *ABCC* y *ABCG*; por el contrario, los transportadores sinusoidales más relevantes pertenecen únicamente a la subfamilia *ABCC* (Marin, 2008). Además, estas proteínas participan en otros procesos fisiológicos, como la homeostasis de esteroides y la inmunidad. En un

estudio realizado en la colección de líneas celulares del *US National Cancer Institute* (NCI), en el que se analizó la expresión de 48 genes de la familia ABC, se demostró una correlación entre la expresión de varios de estos y la disminución de la sensibilidad al tratamiento antineoplásico (Leabman, 2003).

Entre los mecanismos englobados en el MOC-1b cabe destacar la sobreexpresión del gen *ABCC2*, el cual codifica para la proteína MRP2, que se localiza en la membrana apical de células polarizadas, como los hepatocitos o las que constituyen el epitelio del túbulo proximal del riñón y el epitelio intestinal (Nies, 2007). Entre otros tejidos, MRP2 presenta una mayor expresión en el hígado sano donde desempeña un papel fundamental en la detoxificación hepática, mediando la excreción a la bilis de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos (Jedlitschky, 2006). Su especificidad de sustrato es amplia, aunque tiene una mayor afinidad por los conjugados de glutatión, glucuronato y sulfato, compuestos lipofílicos como leucotrieno C4, bilirrubina y algunos esteroides (Nies, 2007). También se encarga del transporte de algunos fármacos antitumorales: clorambucilo, ciclofosfamida, metotrexato, cisplatino, antraciclinas, camptotecinas y podofilotoxinas (Nies, 2007). La gran relevancia clínica de la MRP2 radica en su respuesta adaptativa encaminada a incrementar la eliminación biliar del fármaco y/o sus metabolitos y su capacidad, por tanto, para conferir resistencia a una gran variedad de fármacos antitumorales en tumores sólidos (Haimeur, 2004).

2.3.3.2. DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR DEL FÁRMACO (MOC-2)

En el grupo MOC-2 se incluyen cambios en las enzimas responsables de la activación de profármacos inactivos a compuestos activos o que están implicadas en el metabolismo de fármacos para producir metabolitos inactivos (Marin, 2010).

Un ejemplo lo constituye la pérdida de sensibilidad al 5-FU debido a la reducción de la expresión o a la pérdida de la función de enzimas implicadas en la activación de este potente agente antitumoral (Evrard, 1999). Dentro de las células el fármaco debe ser convertido en el compuesto activo que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, por un proceso complejo que implica la timidina fosforilasa, uridina fosforilasa y orotato fosforribosil transferasa.

La inactivación de fármacos por las células tumorales ocurre por reacciones de óxido-reducción, mediante enzimas de fase I como las relacionadas con el citocromo P450, o por conjugación con ácido glucurónico, sulfato o glutatión mediante enzimas de fase II. Por ejemplo, un incremento en la actividad de algunas enzimas UDP-glucuroniltransferasas (UGTs) como la UGT1A1, UGT1A8 y UGT1A10, que contribuyen a la inactivación de fármacos mediante su conjugación con ácido glucurónico, da lugar al desarrollo de quimiorresistencia. En clínica, este mecanismo se ha asociado con la refractariedad al irinotecán, cuya forma activa, el SN-38, es inactivado por glucuronidación mediada por UGT1A1 (Mathijssen, 2001).

2.3.3.3. CAMBIOS EN LAS DIANAS MOLECULARES (MOC-3)

La alteración de los niveles de expresión o de la actividad de las proteínas diana o de las vías de señalización sensibles a los fármacos antineoplásicos puede tener un gran impacto en la resistencia a fármacos; los mecanismos implicados se engloban en el MOC-3. A continuación se indican dos ejemplos representativos.

El mecanismo de acción de muchos antineoplásicos, como la doxorubicina, está basado en su capacidad de interactuar con las ADN topoisomerasas, enzimas que actúan sobre el estado topológico del ADN facilitando su replicación. En cáncer de hígado se ha observado un aumento de la resistencia a la doxorubicina en aquellas células tumorales con alteraciones en la actividad de la topoisomerasa II, ya sea por aumento de su expresión a nivel de ARNm o por la presencia de mutaciones (Pang, 2005).

El imatinib es un inhibidor de proteínas con actividad tirosina quinasa, debido a que por sus características estructurales bloquea el sitio de unión del ATP en el receptor. El mecanismo de resistencia a este fármaco es la aparición de mutaciones en los receptores tirosina quinasa con los que interactúa, como KIT y PDGFR, que se traducen en una falta total de respuesta (Wardelmann, 2005).

2.3.3.4. CAMBIOS EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN (MOC-4)

La alteración del ADN es la base del mecanismo de acción de muchos fármacos citostáticos. El mecanismo de resistencia a estos agentes parece estar

mediado por un incremento en la capacidad de reparación del ADN en las células tumorales (Marin, 2010).

Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia asociados a los diferentes sistemas de reparación del ADN, como la MGMT, NER, BER, MMR, NHEJ y HR. Algunos de los más representativos se indican a continuación.

La sobreexpresión de la proteína ERCC1, implicada en NER, se ha asociado a la resistencia a cisplatino y sus derivados en varios tipos de cáncer (Fautrel, 2005).

Defectos en los genes implicados en MMR dan lugar al fenotipo de inestabilidad de microsatélites, que se caracteriza por la aparición de un incremento en la tasa de mutagénesis y confiere a la célula una alta tolerancia a la modificación del ADN por agentes químicos como el cisplatino (Jansen, 2012). Así, la pérdida de algunos elementos de este sistema de reparación favorece la capacidad de las células con daños graves en el ADN para eludir la apoptosis.

2.3.3.5. CONTROL DEL BALANCE SUPERVIVENCIA/APOPTOSIS (MOC-5)

La inactivación de determinados genes es crucial para el control del crecimiento celular. Algunos de los genes implicados en la regulación del ciclo celular se reactivan en las células tumorales y llegan a expresarse de nuevo, dando como resultado un crecimiento celular descontrolado y una disminución en la sensibilidad a la quimioterapia.

Muchos fármacos antitumorales actúan induciendo la apoptosis en las células tumorales, por lo que las posibles alteraciones de los mecanismos que conducen a la activación de la apoptosis (MOC-5a) se traducen generalmente en un incremento de la resistencia a estos fármacos. Dentro de estos mecanismos se incluyen la pérdida de factores pro-apoptóticos, como Bax o p53. La proteína supresora de tumores p53 desempeña un papel central en el control del ciclo celular, por lo que constituye un factor clave en la inducción de la apoptosis en respuesta a la quimioterapia (Vogelstein, 2004). La funcionalidad de p53 aparece alterada en muchas células tumorales resistentes a fármacos y aproximadamente en el 50% de los tumores aparecen mutaciones en el gen que la codifica (Muller, 2013).

Además, entre los mecanismos que confieren a las células tumorales la capacidad de proliferar está la activación de las vías de supervivencia (MOC-5b).

Incluyen la sobreexpresión de factores anti-apoptóticos, como Bcl-2, los inhibidores de apoptosis (IAPs) o la sobreexpresión de proteínas tirosina quinasa implicadas en la señalización de factores de crecimiento, como el EGF y su receptor EGFR que, en respuesta a TGF α o a EGF, activa vías intracelulares de supervivencia, como PI3K/Akt, ERK1/2, STAT3 y STAT5 (Blume-Jensen, 2001; Rebutti, 2013).

Cuando se sobreexpresa experimentalmente el EGFR en líneas celulares se observa un aumento en la resistencia al tratamiento con fármacos antitumorales (Peghini, 2002). Este hallazgo ha supuesto una vía de actuación prometedora para superar la resistencia de las células tumorales, mediante el diseño de fármacos que bloqueen la actividad de EGFR, como el gefitinib, capaz de bloquear las vías de proliferación y supervivencia celular (Okano, 2006).

El miembro más representativo de los IAPs es la survivina (gen *BIRC5*), una proteína bifuncional que actúa como supresor de la muerte celular y desempeña un papel clave en la división celular. *BIRC5* no se expresa en células diferenciadas de tejidos normales, a diferencia de los demás miembros de esta familia, y su expresión está aumentada en la mayoría de los distintos tipos de células tumorales (Ambrosini, 1997). La sobreexpresión de *BIRC5* está asociada a una tasa de proliferación elevada, un bajo grado de apoptosis, a un mal pronóstico en el caso de algunos tumores como el HCC y a un incremento en la resistencia a fármacos antitumorales como el 5-FU, el cisplatino y el paclitaxel (Morinaga, 2004; Yamamoto, 2008). La quimiorresistencia debida a *BIRC5* es el resultado de su regulación a nivel transcripcional y traduccional, también puede deberse a la pérdida de proteínas represoras como SMAC y a la presencia de modificaciones genéticas. La mutación c. -31G>C, frecuente en su promotor, da lugar a una mayor actividad del mismo y, como consecuencia, a un incremento de los niveles de expresión de *BIRC5*. La reducción experimental de la actividad de los IAPs da como resultado una mayor sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (Yamaguchi, 2005).

2.3.4. PREDICCIÓN DE LA QUIMIORRESISTENCIA EN EL CÁNCER DE HÍGADO

En un estudio de nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo el análisis de la expresión de un centenar de genes implicados en MOC en cáncer hepático, mediante tarjetas microfluídicas o TLDA (Martinez-Becerra, 2012). Se evaluó el nivel de expresión del ARNm de los genes en biopsias de HCC, CGC y hepatoblastoma, y en muestras pareadas de tejido adyacente no tumoral.

En el estudio se observó una considerable heterogeneidad en el perfil de expresión génica de cada tumor. Sin embargo, analizando de modo conjunto los resultados, se demostró la existencia de características comunes en cada tipo de tumor (Figura I-5). Estos cambios fueron la caída de la expresión de *SLCO1B1*, que codifica OATP1B1, de *SLC22A1*, que codifica OCT1, de *CYP1A2*, que codifica para una enzima implicada en la activación de profármacos, y una marcada sobreexpresión de *BIRC5*, que codifica para la survivina (Martínez-Becerra, 2012).

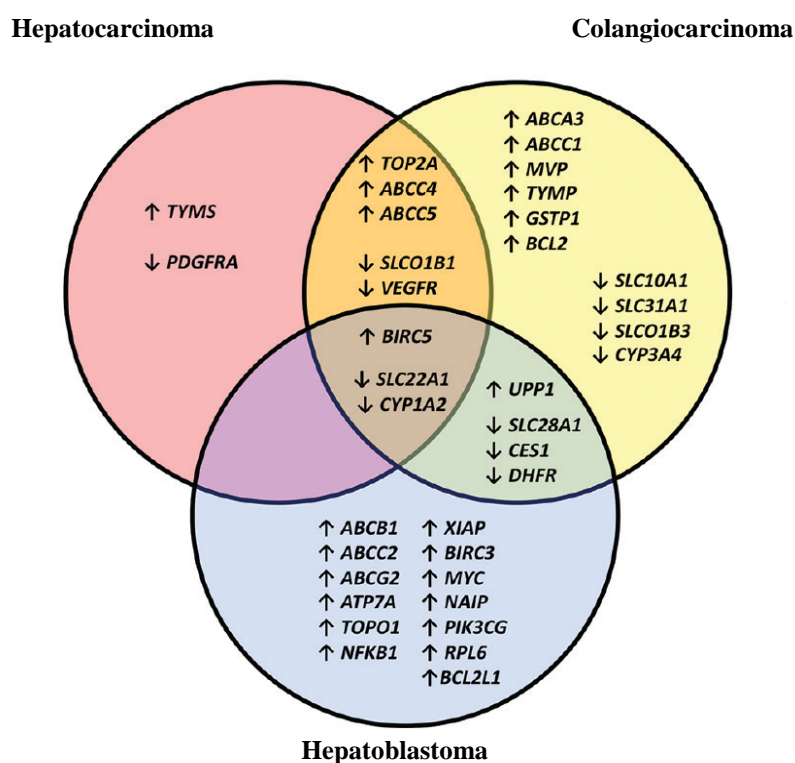


Figura I-5. Perfil de expresión de los distintos genes implicados en los mecanismos de resistencia a la quimioterapia, en carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y hepatoblastoma (Martínez-Becerra, 2012).

*Desarrollo de nuevas
herramientas biotecnológicas para
la manipulación de la
quimiorresistencia y como
biosensores de agentes
genotóxicos*



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1.1. ANIMALES

Para la obtención de hepatocitos se utilizaron ratas macho de la raza Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales tenían libre acceso tanto a la bebida como al pienso granulado comercial (Panlab, Barcelona) y se mantuvieron en habitaciones a temperatura (20°C) y humedad relativa controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Los animales fueron manipulados de acuerdo a las especificaciones de la Comunidad Europea (2010/63/UE) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 1201/2005). Los protocolos experimentales empleados durante la realización de este trabajo fueron aprobados por el comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca.

3.1.1.2. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares que se indican a continuación se compraron a la *American Type Culture Collection* (ATCC; LGC Standards, Barcelona): Caco-2 (HTB-37) y LS174T (CL-188), derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano; HepG2 (HB-8065), de hepatoblastoma humano; Alexander o PCL/PRF/5 (CRL-8024), de hepatoma humano; HEK-293T (CRL-11268), embrionarias de riñón humano; y CHO-K1 (CCL-61), de ovario de hámster chino.

La sublínea celular LS174T/R, parcialmente resistente al cisplatino, había sido obtenida previamente en nuestro laboratorio (Briz, 2003). Las líneas celulares establemente transfectadas con OATP1B1 (CHO-OATP1B1) y con OATP1B3 (CHO-OATP1B3) fueron cedidas por el Dr. Bruno Stieger, del Hospital Universitario de Zúrich (Suiza).

3.1.1.3. BACTERIAS

Se utilizaron distintas cepas bacterianas de *E. coli* que habían sido tratadas químicamente para hacerlas competentes. Las bacterias de la cepa DH5 α fueron suministradas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca. Las de la cepa BL21(DE3) fueron cedidas por el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca. Tanto las bacterias One Shot Mach1-T1^R, de elevada eficacia de transformación, como las One Shot *ccdB* Survival-2 T1^R, utilizadas para amplificar los vectores "pDONR" y "pDEST" utilizados en la clonación Gateway, fueron proporcionadas por Invitrogen (Life Technologies, Barcelona).

3.1.2. PRODUCTOS Y OTRO MATERIAL

Los productos químicos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Air Liquide (Valladolid): Carbógeno, CO₂, N₂ y N₂ líquido.
- Ambion (Life Technologies): Adenosina trifosfato (ATP) y solución de carga para electroforesis en gel desnaturalizante.
- AppliChem (VWR, Barcelona): Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), ácido clorhídrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), β -mercaptoetanol, D-galactosa, dietilpirocarbonato (DEPC), glicerol estéril al 80%, leche descremada liofilizada y L-glicina.
- Applied Biosystems (Life Technologies): Reactivos para PCR cuantitativa "Power SYBR Green PCR Master Mix".
- BD Biosciences (Madrid): Colágeno de tipo I y fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo.
- Bionline (Ecogen, Barcelona): Taq ADN polimerasa.
- Biomers (Ulm, Alemania): Oligonucleótidos cebadores o *primers*.

- Bio-Rad (Madrid): Membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, solución de acrilamida/bis-acrilamida al 30%, tampón Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8, tampón Tris-HCl 1,5 M de pH 8,8 y tetrametiletilendiamina (TEMED).
- Clontech (Laboratorios Conda, Madrid): ARN de hígado humano.
- Dako Diagnósticos (Barcelona): Medio de montaje para fluorescencia.
- GE Healthcare (Barcelona): Algunas enzimas de restricción, reactivos para la purificación de ADN de reacciones enzimáticas y geles de agarosa “illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit”, reactivos para la obtención de ARN “illustra RNAspin Mini Kit” o de ADN plasmídico de bacterias “illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit” y los reactivos de revelado de membranas de Western blot “Enhanced ChemioLuminiscence” (ECL), que incluyen los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección.
- Gibco (Life Technologies): GlutaMAX, medio de cultivo Opti-MEM, mezcla de antibióticos y antimicótico (10.000 U/ml penicilina, 10.000 µg/ml estreptomina y 25 µg/ml anfotericina B), suero bovino fetal (FBS), sulfato de geneticina G-418 y sulfato de kanamicina.
- Invitrogen (Life Technologies): Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), marcadores de tamaño molecular de ADN y de ARN, medio SOC, mezclas enzimáticas “Gateway BP Clonase II” y “Gateway LR Clonase II”, plásmidos pcDNA3.1/Hygro(+), pcDNA6.2/V5-DEST y pcDNA6.2/V5/GW/CAT, *primers* “M13 forward (-20)” y “M13 reverse”, proteinasa K, reactivos para PCR con AccuPrime Pfx ADN polimerasa, reactivos para transfección de células (reactivo Plus y Lipofectamina LTX), reactivos para la transcripción reversa (RT) “SuperScript VILO Master Mix”, SYBR Green I para teñir ADN en geles de agarosa (SYBR Safe) y vectores donadores para clonación Multisite Gateway.
- Laboratorios Abbott (Madrid): Pentobarbital sódico (Nembutal).
- Lonza (Basilea, Suiza): Marcador de pesos moleculares de proteínas “ProSieve QuadColor Protein Marker, 4,6-300 kDa”.
- Merck-Millipore (VWR): Acetato de butilo, acetato de etilo, acetato sódico anhidro, ácido acético glacial, bromuro de etidio, cloroformo, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro sódico, dodecil sulfato sódico (SDS), formaldehído, isopropanol, metanol, reactivo de Folin-Ciocalteu, sulfato magnésico y Tween 20.

- Molecular Probes (Life Technologies): 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor-488.
- Novex (Life Technologies): Anticuerpo monoclonal de ratón anti-V5.
- Panreac (Prosisa, Salamanca): Dicromato potásico, ioduro potásico, nitrato de plata y nitrato de plomo.
- Promega (Madrid): Algunas enzimas de restricción, reactivos para medir la actividad de la luciferasa “Steady-Glo Luciferase Assay System”, T4 ADN ligasa y T4 polinucleótido quinasa.
- Pronadisa (Laboratorios Conda): Agar, agarosa D1 de baja electroendósmosis, agarosa MS-8 de alta resolución, agarosa LM GQT de bajo punto de fusión, extracto de levaduras y triptona.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): Reactivos para la obtención de ADN genómico “QIAamp DNA Blood Mini Kit” y ARN bacteriano “RNeasy Mini Kit” y “RNAprotect Bacteria Reagent” y lisozima.
- Sigma-Aldrich (Madrid): Ácido fosfomolibdico, ácido linoleico, ácido ursodesoxicólico (AUDC), albúmina sérica bovina – fracción V, ampicilina, apotransferrina, azul de bromofenol, azul de Tripán, bicarbonato sódico, bromuro de hexadimetrina (polibreno), butirato sódico, cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino), cloranfenicol, cloruro de cadmio, colagenasa de tipo IV, dexametasona, D-glucosa, dimetilsulfóxido (DMSO), etanolamina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), glicerol, IGEPAL CA-630 o Nonidet-P40, insulina, ioduro de propidio (IP), isotiocianato de fluoresceína (FITC), L-prolina, medios de cultivo DMEM, MEM, RPMI-1640 sin rojo fenol y Williams’ Medium E, mezcla de inhibidores de proteasas (AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina A), nicotinamida, ornitina, paclitaxel, piruvato sódico, polietilenimina (PEI), sal sódica de los ácidos desoxicólico (ADC), glicocólico (AGC), glicoquenodesoxicólico (AGQDC), glicoursodesoxicólico (AGUDC), litocólico (ALC) y quenodesoxicólico (AQDC), selenito sódico, sulfato de cobre, tiazol azul de tetrazolio (MTT), tioacetamida (TAA), tripsina de páncreas porcino y Tris(hidroximetil) aminometano base (Tris base) o clorhidrato (Tris-HCl).
- Takara (Laboratorios Conda): Algunas enzimas de restricción y solución de carga para electroforesis en gel.

- Thermo Fisher Scientific (Madrid): Algunas enzimas de restricción.
- USB (Isogen, Barcelona): Ponceau S.
- VWR (Barcelona): Benceno, carbonato sódico, cloruro potásico, dihidrógeno fosfato (V) potásico, etanol de grado analítico, hidrógeno fosfato (V) sódico, hidróxido sódico, papel indicador de pH, sulfato sódico y tartrato disódico.

Otros productos y plásmidos usados se han obtenido en nuestro laboratorio:

El cis-diamino-bisursodesoxicolato platino (II) o Bamet-UD2 fue sintetizado en nuestro laboratorio mediante la unión de dos moléculas de AUDC al cisplatino (Criado, 2000). El cis-diamino-clorocolilglicinato platino (II) o Bamet-R2 fue sintetizado mediante la unión de una molécula de AGC al cisplatino (Criado, 1997). La pureza de ambos compuestos fue mayor del 95% determinado por cromatografía en capa fina (TLC) y absorción atómica de platino. La mayor parte de los materiales contaminantes fueron los ácidos biliares utilizados en la síntesis.

La colilglicilaminofluoresceína (CGamF), un derivado fluorescente de un ácido biliar, fue sintetizada por conjugación del grupo amida del FITC con el grupo carboxilo del AGC (Sherman, 1986). La contaminación con FITC y AGC estaba por debajo de los límites detectables por TLC.

El vector de destino pcDNA6.2/V5-pL-DEST para clonación Gateway y los plásmidos recombinantes que contenían distintas regiones del promotor de MRP2 o el gen *reporter* luciferasa (Herraez, 2012), así como el pcDNA3.1/OATP1B3, que contenía la ORF del OATP1B3 (Vicens, 2007) habían sido clonados previamente en nuestro laboratorio.

Los plásmidos lentivirales pWPI, psPAX2 y pMD2.G fueron cedidos por el Dr. Ángel Hernández de la Universidad de Salamanca.

Otro material utilizado en este trabajo se obtuvo de las siguientes casas comerciales:

- Afora (Madrid): Material de vidrio.
- Applied Biosystems: Tubos de plástico para PCR cuantitativa.
- BD Biosciences (Madrid): Cámaras multipocillo Lab-tek.

- DueroLab (Salamanca): Cámaras Thoma para el conteo de células y cubetas de cuarzo Hellma para espectrofotometría.
- Menarini Diagnostics (Barcelona): Portaobjetos Optiplus.
- Merck-Millipore (VWR): Placas de gel de sílice para la TLC (60 F254, 20 x 20 cm) sobre soporte de aluminio, de 0,2 mm de espesor y sobre soporte de vidrio de 2 mm de espesor y filtros Stericup (Millipore) de 0,2 μm para la esterilización de las soluciones.
- Sartorius (Madrid): Filtros de nitrato de celulosa de 0,2 μm y de 0,45 μm de tamaño de poro.

Para cultivos celulares se utilizaron frascos Roux, placas, tubos, criotubos, pipetas serológicas y puntas de pipeta estériles de las marcas Corning, Nunc y TPP (Thermo Fisher). Para el cultivo de bacterias se utilizaron tubos de 13 ml de la marca Sarstedt (Barcelona).

También se utilizaron tubos pequeños de las marcas Bio-Rad y Eppendorf (VWR).

3.1.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid). Para pesar los animales se utilizó también una balanza electrónica digital Precisa 600 C (Grupo Taper).

El pH se midió con un electrodo Crison PH BASIC 20 (Crison Instruments, Barcelona).

Se utilizaron equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro10 Plus y Milli-Q185 Plus para obtener agua destilada y ultrapura, respectivamente (Millipore).

Las centrifugaciones se realizaron en las centrífugas refrigeradas Beckman Avanti J-20 y L8-M Ultracentrifuge, rotor SW-28 (Beckman Instruments, Madrid) y Eppendorf 5417R y 5810R (Thermo Fisher).

Las medidas espectrofotométricas se hicieron con un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper), un lector de placas modelo ELx808 (BioTek, Izasa, Barcelona) y un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher).

Las sonicaciones se realizaron un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab, Barcelona).

Las incubaciones se llevaron a cabo en baños tipo “fuera borda” (Prosisa), en un baño termostatzado LAUDA Ecoline StarEdition RE106 y en un bloque térmico QBA2 Grant (Thermo Fisher).

Las PCRs analítica y de alta fidelidad y la RT se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycle ep gradient (Thermo Fisher). Los reactivos de PCR cuantitativa se manejaron dentro de una campana de flujo laminar Euroclone modelo Aura Mini (Milán, Italia) y las PCR cuantitativas a tiempo real se realizaron en un aparato ABI PRISM 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.

La secuenciación del ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, utilizando un secuenciador automático capilar ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se llevó a cabo en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 (Ecogen) acoplado a una fuente PowerPac 3000 (Bio-Rad).

La electroforesis de proteínas tuvo lugar en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación PowerPac Basic (Bio-Rad). La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II (Bio-Rad) utilizando para ello la misma fuente de alimentación.

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos, la luminiscencia de las membranas de Western blot y la luminiscencia debida a la actividad luciferasa se empleó un equipo de análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid). La toma de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0 (Fujifilm).

Para el crecimiento de bacterias a 37°C se utilizó una estufa termostatzada Memmert modelo 600 (Izasa). Para el cultivo de bacterias en medio líquido en agitación se usó un agitador orbital (Infors HT, Basilea, Suiza).

Para el cultivo de líneas celulares se utilizaron campanas de flujo laminar Telstar AV-30/70 y BIO-IIA (Telstar, Barcelona). Las células se mantenían a 37°C en un incubador termostatzado con atmósfera de CO₂ humidificada de Thermo Hepa Class 100 (Thermo Fisher). Para hacer filtraciones a vacío se emplearon bombas Millipore modelo XX5522050 (Millipore) y Gast modelo DOA P104-BN (Gast Group Ltd., Redditch, Reino Unido). La bomba peristáltica utilizada fue del tipo Masterflex 7554-20, de Cole Parmer (Thermo Fisher).

La fluorescencia se visualizó en un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (DuroLab) y en un microscopio confocal Leica SP5 perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).

El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences). El programa informático utilizado para la adquisición y análisis de datos fue el CellQuest Pro, de la misma casa comercial.

La determinación de Cr y Pt se llevó a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (Z-8100 Polarized Zeeman) de la casa Hitachi utilizando cubetas tipo tubo pirolíticas, de Laboratorios Conda, y lámparas de cátodo hueco de la casa Photron (Victoria, Australia).

Las muestras se conservaron en congeladores de -20°C y -80°C (Grupo Taper) o en contenedores de nitrógeno líquido (Thermo Fisher).

El material de vidrio utilizado en biología molecular se trataba mediante calor seco a 180°C durante 3 h en una estufa Memmert modelo 500 (Izasa).

Para la esterilización de líquidos y material sólido se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (DuroLab).

Además se contó con pequeño equipamiento como agitadores magnéticos, de vaivén, Vortex y picofugas de las marcas Selecta (DuroLab), Boeckel, IKA y Galaxy Ministar (VWR). También se utilizaron micropipetas Gilson (Prosisa) y Eppendorf (VWR) y dispensadores Pipet-Aid Drummond (VWR).

3.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATA

3.2.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Para la obtención de hepatocitos se siguió el método de Berry *et al.* (Berry, 1969) con algunas modificaciones (Monte, 1999). Se utilizaron ratas macho de la raza Wistar con un peso aproximado de entre 220 y 250 g, que se mantuvieron en ayunas desde la noche anterior.

El procedimiento quirúrgico se inició tras anestésiar al animal con pentobarbital (50 mg/kg peso corporal), administrado por vía intraperitoneal. Una vez afeitado y desinfectado el campo operatorio con etanol al 70%, se practicaba una laparotomía ventral media. A continuación, se colocaban varios hilos para realizar ligaduras en la vena gastroduodenal, la arteria hepática, la vena porta y la vena cava inferior, justo por encima de los pedículos renales. Se procedía entonces a la canulación de la vena porta, a través de la cual se iniciaba una pre-perfusión con PBS sin calcio (previamente gaseado con carbógeno y calentado a 37°C). Rápidamente, se daba un corte en la vena cava inferior a nivel abdominal y se cerraban todas las vías de salida excepto la vena cava inferior, en la que se insertaba una cánula a través de la aurícula derecha. Esta primera perfusión se mantenía, de manera no recirculante, durante 10 min a una velocidad aproximada de 40 ml/min.

El siguiente paso era la perfusión del hígado con una solución de colagenasa (75 U/ml) de manera recirculante durante 5-8 min, hasta que se observaba un cambio claro en la consistencia del hígado. A continuación, se extraía el hígado y se colocaba en un crisol con 10 ml de la solución de colagenasa. El tejido se disgregaba mecánicamente. Seguidamente, se mezclaba con PBS con calcio hasta obtener un volumen de aproximadamente 200 ml y la suspensión resultante se pasaba por 2 mallas de diferente tamaño para retirar el tejido no disgregado.

Para eliminar las células no parenquimales y las células muertas o dañadas se realizaban cuatro centrifugaciones a 43 xg durante 2 min a 4°C. El precipitado resultante se resuspendía en PBS con calcio, excepto en la tercera centrifugación en la que se resuspendía en PBS con calcio y 5% de albúmina. La última centrifugación se realizaba en las mismas condiciones durante 4 min y finalmente se resuspendía en medio de anclaje para determinar la viabilidad de la preparación por el test del azul de Tripán. Si el porcentaje de hepatocitos vivos era elevado ($\geq 85\%$), se procedía a la realización de los experimentos.

3.2.2. OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE LA TIOACETAMIDA

Los hepatocitos aislados se sembraron en placas recubiertas de colágeno tipo I con medio de anclaje (que contenía William's Medium E, NaHCO₃, HEPES, Na₂SeO₃, dexametasona, D-galactosa, insulina y una mezcla de antibióticos y antimicótico) y se incubaron a 37°C durante 90 min, para permitir la adhesión de las células a las placas. Transcurrido ese tiempo se retiró el medio de anclaje (junto con las células no viables que no se habían pegado) y se sustituyó por medio de cultivo (medio de anclaje suplementado con ácido linoleico, albúmina, EGF, etanolamina, nicotinamida, ornitina, transferrina y FBS). Los experimentos se iniciaron inmediatamente tras el anclaje de las células y se finalizaron transcurridas 24 h del cultivo, para evitar la desdiferenciación hepatocitaria.

Para obtener el medio condicionado que contenía los metabolitos de la TAA, los hepatocitos en cultivo primario se incubaron en placas de 3 cm de diámetro, a una densidad de 1×10^6 células/placa, durante 24 h con medio suplementado con diferentes concentraciones de TAA (5-75 μ M). A continuación, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en 100 μ l de agua ultrapura para obtener los lisados celulares, que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.3. CULTIVO DE BACTERIAS

Soluciones utilizadas

- Medio Luria-Bertani (LB): 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras y 10 g/l NaCl; pH 7,0. Las placas de medio LB-agar tenían 15 g/l de agar.
- Medio SOC: 20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa; pH 7,0.

Tanto el medio LB como el SOC se autoclavaron para su esterilización.

3.3.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO

Antes de iniciar la transformación, las bacterias que habían sido tratadas para adquirir un estado de competencia y permanecían congeladas a -80°C, se descongelaron lentamente sobre hielo. Una vez descongeladas se mezclaron con 2 μ l del plásmido de interés (entre 5 y 25 ng) que iban a internalizar. La mezcla se incubó en hielo durante 25 min. Para facilitar la entrada del plásmido hacia el interior celular, las

bacterias se sometieron a un choque térmico, que consistió en elevar la temperatura a 42°C durante un rango de tiempo variable según la cepa bacteriana (20 s en el caso de BL21(DE3) y 2 min para DH5 α). Seguidamente se enfriaron en hielo durante 2 min. Sobre la mezcla se añadieron 500 μ l de medio SOC y se incubaron en agitación durante 1 h a 37°C.

3.3.2. SIEMBRA DE BACTERIAS

En el caso de las bacterias que habían sido transformadas, aproximadamente un tercio del volumen se sembró en condiciones de esterilidad por extensión con un asa de vidrio en una placa con medio LB y agar suplementado con el antibiótico de selección adecuado: 100 μ g/ml de ampicilina, 30 μ g/ml de cloranfenicol o 50 μ g/ml de kanamicina. Se incubaron en una estufa a 37°C durante aproximadamente 16 h.

Cuando se querían crecer bacterias no transformadas, de una reserva de bacterias congeladas a -80°C en glicerol al 80% se tomó una pequeña muestra raspando la superficie con una punta estéril que, seguidamente, se inoculó en un volumen de 200 μ l de medio LB. A continuación, parte del volumen se sembró por extensión con un asa de vidrio en una placa con LB suplementado con 15 g/l agar, en condiciones de esterilidad. La placa sembrada se incubó durante aproximadamente 16 h a 37°C.

3.3.3. SELECCIÓN DE COLONIAS Y CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO

A partir de las placas en las que se habían sembrado bacterias transformadas, se seleccionaron algunas de las colonias que aparecían bien definidas, aisladas y sin la presencia de colonias satélites. Cada una de ellas se raspó con una punta de pipeta estéril y se inoculó en 6 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección adecuado. Posteriormente, se incubaron en agitación a 37°C durante un período de tiempo variable dependiendo de su aplicación posterior.

3.3.4. CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO SIN SELECCIÓN DE COLONIAS

En los casos en los que no se precisaba de la selección de colonias, sobre la superficie de la placa donde habían crecido bacterias, transformadas o no, se añadieron 2 ml de medio LB. La placa se agitó de forma manual con el fin de arrastrar bacterias de las diferentes colonias y se recuperó una parte del volumen para inocularlo en un volumen mayor de medio LB (variable según el número de condiciones experimentales), de manera que la densidad óptica inicial del cultivo bacteriano a una λ de 600 nm estuviese en torno a 0,05 UA. El medio sobre el que se añadió el inóculo estaba precalentado a 37°C y suplementado o no con el antibiótico de selección, dependiendo de si las bacterias habían sido transformadas o no, respectivamente. En todo momento se mantuvieron las condiciones de esterilidad.

3.3.5. PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO DE CULTIVOS DE BACTERIAS

Se utilizó el kit comercial “illustra PlasmidPrep Mini Spin”, que se basa en aplicar el lisado de bacterias obtenido en condiciones alcalinas sobre una membrana de gel de sílice.

Se partía de un cultivo de bacterias crecidas a partir de una colonia, que se precipitaron en tubos de plástico por centrifugación a 16.000 xg y 4°C para eliminar el medio de cultivo. El precipitado se resuspendió en un tampón que contenía ARNasa A, para eliminar el ARN bacteriano. A continuación, las bacterias se lisaron con una solución detergente alcalina. El ADN cromosómico, las proteínas y los restos celulares se precipitaron con una solución ácida, que contenía sales caotrópicas y ácido acético. También se neutralizó el pH del lisado y se ajustaron las condiciones de alta salinidad adecuadas para la adsorción del ADN. Después de centrifugar el lisado, se añadió el sobrenadante a la columna y tras lavar la membrana, el ADN plasmídico se eluyó en condiciones de baja salinidad, en tampón TE de pH 8,0.

3.3.6. CONGELACIÓN DE BACTERIAS

Los clones de bacterias que se querían congelar se incubaron en medio LB con el antibiótico de selección adecuado a 37°C y en agitación, hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,5 y 0,7 UA a una λ de 600 nm, que indicaba que las bacterias se encontraban en fase de crecimiento exponencial. La suspensión de bacterias se mezcló

con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración del 25%. Los criotubos se congelaron sumergiéndolos brevemente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

3.3.7. ESTUDIOS DE TOXICIDAD EN BACTERIAS

Preparación de las soluciones de los tóxicos

El Pb(NO₃)₂, el CdCl₂, el K₂Cr₂O₇ y la sal sódica de los distintos ácidos biliares (ADC, AGC, AGQDC, AGUDC y AQDC) se disolvieron en un volumen determinado de agua ultrapura para preparar una disolución madre por debajo del límite de solubilidad de cada compuesto. El cisplatino y la sal sódica del ALC se disolvieron en DMSO. A partir de esta solución se preparó el resto de disoluciones de menor concentración por dilución seriada. De esta manera, de cada una de las disoluciones se añadió el mismo volumen (entre 10 y 50 µl) a cada uno de los cultivos sobre los que se iba a evaluar la toxicidad.

Determinación del efecto sobre el crecimiento celular

Se partía de cultivos en medio líquido de bacterias *E. coli* BL21(DE3) que no habían sido sometidas a transformación. Cuando el cultivo bacteriano alcanzó una densidad óptica a λ de 600 nm de 0,3 UA, tras la incubación en agitación a 37°C, se repartió en tubos de plástico de 13 ml ventilados (5 ml/tubo) en los que se había depositado previamente el volumen correspondiente de una determinada disolución del compuesto cuyo efecto tóxico se quería determinar. En todo momento se trabajó en condiciones de esterilidad.

Los tubos con el cultivo expuesto a la acción de un determinado compuesto se mantuvieron en agitación a 37°C y cada hora, durante un período de 4 h de crecimiento celular, se extraía una alícuota (300-600 µl) de cada tubo para medir su absorbancia a λ de 600 nm en el espectrofotómetro y así determinar el crecimiento celular. Se hicieron diluciones de las muestras extraídas, de manera que el valor dado por el espectrofotómetro no superara 0,8 UA y, de ese modo, trabajar en un rango que asegurara fiabilidad de los resultados. Como blanco de medida se utilizó medio LB y se comprobó que los compuestos ensayados no interfirieran en el valor de absorbancia.

3.3.8. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN *recA*

Las bacterias BL21(DE3) transformadas con el vector de expresión pcDNA6.2-prRecA-Luc2 se inocularon en medio líquido sin llevar a cabo una selección previa de colonias aisladas. El cultivo bacteriano se mantuvo en agitación a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica a λ de 600 nm de 0,3 UA, momento en el cual se repartió en diferentes tubos de plástico ventilados de 13 ml (5 ml/tubo), donde previamente se había añadido un volumen determinado de una disolución del compuesto a evaluar. Las disoluciones de los contaminantes se prepararon siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado anterior.

Se llevó a cabo la puesta a punto del procesamiento de las muestras que se describe en el apartado 4.1.3. de Resultados y Discusión, para evaluar la actividad del promotor del gen *recA* a partir de la medida de actividad luciferasa.

3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Soluciones comunes utilizadas

- Tampón MOPS: 20 mM MOPS, 8 mM acetato sódico y 1 mM EDTA; pH 7,0.
- Tampón TAE: 40 mM Tris base, 1 mM EDTA y 20 mM ácido acético; pH 8,3.
- Tampón TE: 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA; pH 8,0.

3.4.1. DISEÑO DE CEBADORES

Los oligonucleótidos cebadores o *primers* se diseñaron utilizando como referencia la secuencia del ARNm específica para cada gen o del ADN genómico, publicadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), mediante el programa “OligoAnalyzer 3.1” (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>). Los *primers* utilizados en RT-PCR cuantitativa se diseñaron, en la medida de lo posible, a caballo entre dos exones codificantes, para minimizar los problemas derivados de la contaminación de las muestras de ARN con ADN genómico y transcritos primarios (pre-ARNm). Su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el manejo de las secuencias de ADN se usó el programa “Gene Construction kit 2.5.13” para MacOS X (Textco Biosoftware, New Hampshire, EE.UU.).

Una vez diseñados los cebadores, estos fueron suministrados liofilizados por las casas comerciales. Antes de su uso, se solubilizaron en agua ultrapura y se valoraron por espectrofotometría a una λ de 260 nm.

3.4.2. PCR ANALÍTICA

Se utilizó la enzima Taq ADN polimerasa, con una mezcla de reacción que contenía solución tampón, $MgCl_2$, dNTPs, *primers* y ADN molde. Los tubos se incubaron en el termociclador con las siguientes condiciones experimentales de tiempo y temperatura:

- un ciclo de activación a 94°C durante 2 min
- entre 25 y 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante un tiempo variable (1 min por cada kb del amplicón)
- un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min.

Los productos obtenidos tras la PCR se visualizaron tras la electroforesis en geles de agarosa (apartado 3.4.4.).

3.4.3. PCR ANALÍTICA DE ALTA FIDELIDAD

Se preparó una mezcla con los reactivos suministrados en el kit “AccuPrime *Pfx* SuperMix”, que contenía la enzima ADN polimerasa *Pfx* de alta fidelidad, $MgCl_2$, dNTPs, solución tampón y estabilizadores; junto con los *primers* y ADN molde. Los tubos se incubaron en el termociclador, que se programó con las siguientes condiciones experimentales de tiempo y temperatura:

- un ciclo de activación a 95°C durante 5 min
- entre 30 y 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante un tiempo variable (1 min por cada kb del amplicón)
- un ciclo final de extensión a 68°C con una duración de 10 min.

En algunos casos se utilizó un gradiente de temperatura de anillamiento.

Los productos obtenidos en la PCR se visualizaron en geles de agarosa tras llevar a cabo una electroforesis y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN contenido en la agarosa (apartado 3.4.6.).

3.4.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA NO DESNATURALIZANTE

Para preparar los geles de agarosa se mezcló tampón TAE con 1% de agarosa, se calentó a ebullición para disolverla y se añadió SYBR Green I para teñir el ADN. Tras polimerizar la agarosa en un molde con el peine adecuado al número de muestras, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con un 10% de solución de carga antes de depositarse en los pocillos del gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se empleó un estándar de 1 kb o 100 pb, según el caso. Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica a una velocidad constante de 80 a 120 V durante aproximadamente una hora. El ADN teñido con SYBR Green I se visualizó en un equipo de análisis de imagen LAS-4000.

3.4.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DESNATURALIZANTE

Para la preparación del gel se utilizó agarosa al 1% en tampón MOPS y 9,2% de formaldehído en agua DEPC. Una vez disuelta la mezcla y polimerizado el gel, éste se colocó en una cubeta de electroforesis con tampón MOPS. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturalizante que contenía 50 µg/ml de bromuro de etidio y se calentaron a 75°C durante 10 min antes de cargarlas en el gel. Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica y el ADN marcado con bromuro de etidio se visualizó a la luz UV.

3.4.6. PURIFICACIÓN DEL ADN CONTENIDO EN GELES DE AGAROSA Y REACCIONES ENZIMÁTICAS

Tras la visualización de los productos de PCR separados por electroforesis en un gel de agarosa, se cortó el fragmento del gel que contenía la banda correspondiente al ADN de interés bajo luz azul de λ de 460 nm. Se usó el kit “illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification” para extraer y purificar el ADN siguiendo el protocolo que dictaba la casa comercial. La agarosa se disolvió calentando la solución correspondiente a 60°C durante 15 min, el ADN se purificó en una columna y se eluyó con tampón TE o agua, dependiendo de su aplicación posterior.

El ADN obtenido en una reacción enzimática se purificó usando columnas del mismo kit, aplicando el protocolo correspondiente.

La concentración de ADN tras la elución, en ambos casos, se determinó por espectrofotometría a λ de 260 nm.

3.4.7. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El ADN se mezcló con el tampón de reacción adecuado para la enzima usada, albúmina sérica bovina, la enzima de restricción y agua ultrapura. La reacción de restricción se incubó entre 3 y 6 h a 37°C. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa. Sus tamaños se calcularon por comparación con estándares de ADN.

3.4.8. SECUENCIACIÓN

La secuenciación del ADN para comprobar la identidad de los plásmidos clonados y de los productos de PCR se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. Se llevó a cabo una secuenciación de terminación de la cadena de tipo Sanger partiendo de 500 ng de ADN plasmídico y 3,3 pmol de un *primer* específico disueltos en 8 μ l de agua ultrapura, y 2 μ l del reactivo “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems). El análisis de los cromatogramas tras la electroforesis capilar se realizó con el programa informático FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer, Seattle, EE.UU.) y para la visualización de las secuencias de ADN se usó el programa Gene Construction Kit.

3.5. TÉCNICAS DE CLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN GATEWAY

3.5.1. CLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN GATEWAY

3.5.1.1. FUNDAMENTO

Es una tecnología de clonación basada en el sistema de recombinación del bacteriófago lambda, a partir del cual tiene lugar su integración en el ADN de *E. coli* y el cambio entre el ciclo lítico y lisogénico. La recombinación es el resultado de dos reacciones de intercambio y ligación (reacciones BP y LR) que tienen lugar a partir de unas secuencias específicas denominadas sitios *att*.

En la reacción BP, mediada por la integrasa (Int) y el factor de integración del hospedador (IHF), se recombinan los sitios *attB*, que flanquean un fragmento de ADN de interés, con los sitios *attP* localizados en un vector donador (pDONR); dando lugar a sitios *attL* en un vector “pEntry” y sitios *attR* en un producto secundario de la reacción.



Figura MM-1. Esquema de la reacción de recombinación BP.

La reacción LR, que está catalizada por Int, IHF y la excisionasa (Xis), consiste en la recombinación entre los sitios *attL* del vector “pEntry” resultante de la reacción BP que flanquean el ADN de interés y los sitios *attR* de un vector destino, generándose sitios *attB* en un vector de expresión que contiene la secuencia de interés y sitios *attL* en un producto secundario de la reacción.

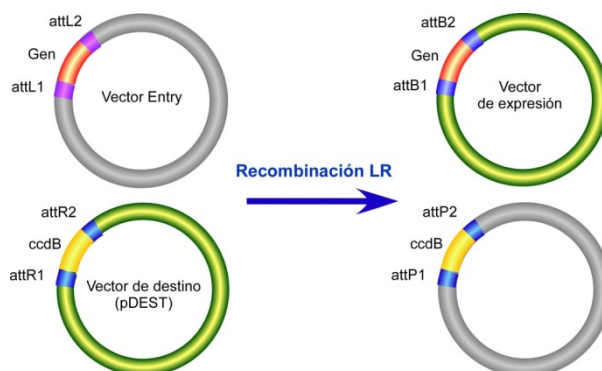


Figura MM-2. Esquema de la reacción de recombinación LR.

Las reacciones de recombinación específicas de sitio catalizadas por las recombinasas descritas anteriormente se caracterizan por ser conservativas (no suponen una ganancia o pérdida de nucleótidos) (Landy, 1989), altamente específicas y por conferir direccionalidad a la reacción de recombinación (Hartley, 2000). De esta manera se consigue transferir fragmentos de ADN entre diferentes vectores de manera que mantengan su orientación, su secuencia inicial y su fase de lectura.

La selección adecuada de las colonias transformadas con el vector que contiene el gen de interés es posible gracias a la resistencia a un antibiótico, adquirida

durante el proceso de transformación con el vector de expresión final, y al marcador de selección *ccdB*. El gen *ccdB* codifica una proteína que interacciona con la girasa bacteriana e inhibe el crecimiento celular, de manera que impide la proliferación de bacterias que hayan sido transformadas con el plásmido pDONR o pEntry no recombinado o productos secundarios de las reacciones de recombinación. La propagación y amplificación de los vectores que contienen el gen *ccdB* pueden llevarse a cabo en la cepa bacteriana One Shot *ccdB* Survival-2 T1^R de *E. coli*, resistente a la acción tóxica del producto de este gen.

La clonación Gateway permite incluso la transferencia de varios fragmentos de ADN entre diferentes vectores en un único ensayo (Magnani, 2006). A este tipo de recombinación se le denomina “Multisite Gateway”.

Además de las características de especificidad y direccionalidad ya mencionadas, la tecnología de clonación por recombinación Gateway es un método más rápido y eficaz que los procedimientos de clonación tradicionales que implican reacciones de ligación y tratamiento con enzimas de restricción.

3.5.1.2. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO HUMANO Y BACTERIANO

Se utilizó el kit comercial “QIAamp DNA Blood Mini” para aislar ADN genómico de origen humano y bacteriano. En el primer caso se partió de líneas celulares que habían crecido en monocapa y el ADN genómico bacteriano se aisló de bacterias *E. coli* crecidas en medio líquido durante toda la noche a 37°C. En ambos casos se llevó a cabo un tratamiento de las células con proteinasa K para favorecer su lisis y el ADN se purificó a través de una columna con membrana de gel de sílice.

3.5.1.3. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

La amplificación de los fragmentos de ADN de interés se llevó a cabo por PCR de alta fidelidad. El promotor del gen *recA* se amplificó usando como molde ADN genómico de bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3), el promotor de *BIRC5* a partir de ADN genómico extraído de la línea celular humana Alexander, y en el caso de las secuencias codificantes de OATP1B1 y OATP1B3 se usó como molde ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de ARN de hígado humano y el plásmido pcDNA3.1/OATP1B3, respectivamente. Los cebadores utilizados en la PCR se

diseñaron de manera que permitieran amplificar dichas secuencias (Tablas MM-1 – MM-4) e incorporar en los extremos de los fragmentos de ADN amplificados los sitios *attB* correspondientes (Tabla MM-5).

Para obtener el promotor de *BIRC5*, debido a que la región que flanqueaba el sitio de inicio de la transcripción era rica en GC y dificultaba su amplificación por PCR, se llevó a cabo una primera PCR con los *primers* Fw1 y Rv1 (Tabla MM-1) para amplificar una región de 1610 pb comprendida entre los nucleótidos -1524 y +85, tomando como referencia la secuencia U75285. La identidad del fragmento amplificado se confirmó con un estudio de restricción y por secuenciación. A continuación, se amplificó mediante una segunda PCR con los *primers* Fw2 y Rv2 (Tabla MM-1), la región promotora comprendida entre los nucleótidos -1468 y -1, utilizando como molde de 1610 pb el fragmento obtenido previamente.

Tabla MM-1. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados para la clonación y secuenciación del promotor de *BIRC5*.

| Aplicación | Secuencia (5'-3') | Posición (pb) | Tipo |
|------------------------|--------------------------------|---------------|--------|
| Amplificación promotor | CTGGGTGAAGGGTATATGAGTATTCTTTGT | -1524 | Fw1 |
| | CCAAGAAGGGCCAGTTCTTGAATGTA | 85 | Rv1 |
| | AAATTGACATCGGGCCGGG | -1468 | Fw2 |
| | GCCGCCGCCGC | -1 | Rv2 |
| Secuenciación | GTA AACGACGGCCAG | | M13-Fw |
| | CAGGAAACAGCTATGAC | | M13-Rv |
| | CTGGGTGAAGGGTATATGAGTATTCTTTGT | -1524 | Fw |
| | GGGCGATAGAGCGAGACTCAGT | -1196 | Fw |
| | GCCATCACGGTGAAACCTTGTCTCTA | -365 | Rv |
| | GGTGTGCCGGGAGTTGTAGT | -143 | Rv |
| | TTGAGAAAGGGCTGCCAGG | 44 | Rv |

La posición de los *primers* se refiere al codón de inicio de *BIRC5* tomando como referencia la secuencia U75285. Los primers M13-Fw y M13-Rv anillaban en el plásmido. Fw, *forward*; Rv, *reverse*.

Tabla MM-2. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados para la clonación y secuenciación de la ORF de OATP1B1.

| Aplicación | Secuencia (5'-3') | Posición (pb) | Tipo |
|--------------------------|--------------------------|---------------|--------|
| Amplificación ORF | ATGGACCAAAATCAACATTTG | 96 | Fw |
| | ACAATGTGTTTCACTATCTGCCCC | 2168 | Rv |
| Secuenciación | GTAAAACGACGGCCAG | | M13-Fw |
| | CAGGAAACAGCTATGAC | | M13-Rv |
| | ATCATGGACCAAAATCAACATTTG | 93 | Fw |
| | TGGGGCTTCTTACATTGATGAT | 667 | Fw |
| | GCCCCAAACTCCAAATAAACC | 932 | Fw |
| | AACCCAGTGCAAGTGATTTCAAT | 1815 | Rv |

La posición de los *primers* se refiere a la secuencia NM_006446. En el extremo 5' del *primer* Fw utilizado para amplificar la ORF se añadió la secuencia kozak CGCCATC. Los *primers* M13-Fw y M13-Rv anillaban en el plásmido. Fw, *forward*; Rv, *reverse*.

Tabla MM-3. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados para la clonación y secuenciación de la ORF de OATP1B3.

| Aplicación | Secuencia (5'-3') | Posición (pb) | Tipo |
|--------------------------|-----------------------------------|---------------|--------|
| Amplificación ORF | ATGGACCAACATCAACATTTGAATAAAACAGCA | 127 | Fw |
| | GTTGGCAGCAGCATTGTCTTGC | 2232 | Rv |
| Secuenciación | GTAAAACGACGGCCAG | | M13-Fw |
| | CAGGAAACAGCTATGAC | | M13-Rv |
| | GTCCAGTCATTGGCTTTGCA | 782 | Fw |
| | CAACCCAACGAGAGTCCTTAGG | 892 | Rv |
| | TATAGAAGTTGAAACAAGA | 1400 | Rv |

La posición de los *primers* se refiere a la secuencia NM_019844. En el extremo 5' del *primer* Fw utilizado para amplificar la ORF se añadió la secuencia kozak CACC. Los *primers* M13-Fw y M13-Rv anillaban en el plásmido. Fw, *forward*; Rv, *reverse*.

Tabla MM-4. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados para la clonación y secuenciación del promotor de *recA*.

| Aplicación | Secuencia (5'-3') | Posición (pb) | Tipo |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------|------|
| Amplificación promotor | CTTGTGGCAACAATTTCTACAAAACACTTG | -110 | Fw |
| | TTTTACTCCTGTCAAGCCGGGT | -1 | Rv |
| Secuenciación | TAATACGACTCACTATAGGG | | T7 |
| | CTTGTGGCAACAATTTCTACAAAACACTTG | -110 | Fw |
| | TTTTACTCCTGTCAAGCCGGGT | -1 | Rv |

La posición de los *primers* se refiere al codón de inicio de *recA* tomando como referencia la secuencia NC_000913. El *primer* T7 anillaba en el plásmido. Fw, *forward*; Rv, *reverse*.

Tabla MM-5. Secuencia de los adaptadores *attB*.

| Adaptador | Secuencia (5'-3') |
|---------------|---------------------------------|
| <i>attB1</i> | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTNN |
| <i>attB2</i> | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTN |
| <i>attB5r</i> | GGGGACAACCTTTGTATACAAAGTTGN |
| <i>attB5</i> | GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGNN |

En el extremo 3' de los *primers* se añadieron uno o dos nucleótidos adicionales (N) para mantener la fase de lectura con la región *attB*.

3.5.1.4. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR POR RECOMBINACIÓN BP

Cada producto de PCR flanqueado por sitios *attB* se clonó en el vector donador adecuado mediante la reacción de recombinación BP; así los promotores de los genes *recA* y *BIRC5* flanqueados por sitios *attB1* y *attB5r* se clonaron en el pDONR221 P1-P5r, mientras que las secuencias codificantes de OATP1B1 y OATP1B3 flanqueadas por sitios *attB5* y *attB2* se clonaron en el pDONR221 P5-P2. Las reacciones de recombinación BP fueron catalizadas por enzimas contenidas en la mezcla "Gateway BP Clonase II", en condiciones de incubación a 25°C durante 6 h y se inactivaron por tratamiento con proteinasa K.

Se transformaron bacterias *E. coli* One Shot Mach1-T1^R por choque térmico con el producto obtenido en cada reacción BP. A continuación, se sembraron en placas con medio LB y agar suplementado con kanamicina, el antibiótico de selección adecuado al uso de los pDONR221. Se seleccionaron algunas de las colonias y se crecieron en medio LB suplementado con kanamicina para extraer su ADN plasmídico. La identidad de los plásmidos obtenidos se confirmó con un estudio de restricción y por secuenciación, utilizando los *primers* mostrados en las Tablas MM-1 – MM-4.

3.5.1.5. RECOMBINACIÓN LR “MULTISITE GATEWAY”

Con el fin de obtener un vector de expresión en el que se clonaran de forma direccional la secuencia de un promotor con la secuencia codificante de la proteína correspondiente, la recombinación LR se produjo entre dos vectores pEntry, obtenidos en el desarrollo de este trabajo o previamente en nuestro laboratorio, y el vector de destino pcDNA6.2-V5-pL-DEST.

Las reacciones LR fueron catalizadas por la mezcla enzimática “Gateway LR Clonase II” en condiciones de incubación de 25°C durante 16 h y se detuvieron por tratamiento con proteinasa K.

Se transformaron por choque térmico bacterias *E. coli* One Shot Mach1-T1^R con el producto obtenido en cada reacción LR y se siguió el mismo protocolo que se ha explicado en el apartado anterior, utilizando ampicilina como antibiótico de selección de las colonias transformantes. La identidad de los plásmidos obtenidos se confirmó con un estudio de restricción y por secuenciación, utilizando los *primers* mostrados en las Tablas MM-1 – MM-4.

3.5.2. CLONACIÓN CLÁSICA

3.5.2.1. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA: FUNDAMENTO

La estrategia de mutagénesis dirigida que hemos utilizado en este trabajo fue una adaptación del método de Laible *et al.* (Laible, 2009). Consta de dos etapas: la amplificación por PCR del plásmido en dos fragmentos introduciendo en uno de ellos la mutación deseada y la posterior ligación de dichos fragmentos de manera direccional.

3.5.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO Y DIGESTIÓN DE LOS AMPLICONES

En primer lugar se procedió a la amplificación por PCR de alta fidelidad del plásmido recombinante de origen, donde se deseaba introducir la mutación, en dos fragmentos. Se usaron los *primers* Fw2 y Rv2 (Tabla MM-6), que eran específicos de la secuencia del gen de resistencia a ampicilina y además generaban un sitio de corte de la enzima *Adhl*, y otros dos *primers* (Tabla MM-6) que introducían la mutación deseada.

Tabla MM-6. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados para la clonación y mutagénesis dirigida de los plásmidos lentivirales.

| Plásmido clonado | Secuencia (5'-3') | Tipo |
|----------------------|--|------|
| pWPI-pL | CAGGTGTCGTGAGGAATTTGACA | Fw1 |
| | CGGAGCCAATTCCTACTCCTTT | Rv1 |
| pWPI-pL-CS | <u>TATACGTACGGACGGGGAGTC</u> AGGCAACTAT | Fw2 |
| | <u>TATACGTACGGACTCCCCGTC</u> GTGTAGATAACTAC | Rv2 |
| | <u>TATACGTACGACTAGT</u> TTAATTAATCTCGACGGTATCGGTAACTTTTAAAAGA | Fw3 |
| | <u>TATACGTACGGCTAAGC</u> AGACCTAGAAGGTCCATTAGCTGCAAAG | Rv3 |
| pWPI-prMRP2-OATP1B1 | <u>TATACGTACGGCTTAGC</u> TGAACCCATGAGGTCAAGGC | Fw4 |
| | <u>TATACGTACGACTAGT</u> TTAACAATGTGTTTCACTATCTGCCCA | Rv4 |
| pWPI-prBIRC5-OATP1B3 | <u>TATACGTACGGCTTAGC</u> AAATTGACATCGGGCCGGGC | Fw5 |
| | <u>TATACGTACGACTAGT</u> TTAGTTGGCAGCAGCATTGTCTTGC | Rv5 |

El extremo 5' subrayado de los *primers* Fw2 y Rv2 corresponde a un adaptador que contenía el sitio de corte de la enzima *AhdI*, el de Fw3, Rv4 y Rv5, el de la enzima *SpeI*, y el de Rv3, Fw4 y Fw5, el de la enzima *Bpu1102I*. Fw, *forward*; Rv, *reverse*; pL, sin promotor; CS, *cloning site*.

Las bandas visualizadas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% correspondientes a los dos amplicones obtenidos en la PCR se purificaron y se digirieron con la enzima de restricción *Adhl* durante 2 h a 37°C. Como explicamos anteriormente, esta enzima poseía un sitio de corte en uno de los extremos de los amplicones, generando extremos cohesivos que darían direccionalidad a la ligación posterior de ambos fragmentos. Tras la digestión se inactivó la enzima durante 20 min a 65°C.

3.5.2.3. LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

Partimos de dos amplicones con uno de sus extremos cohesivo tras el corte con *Adhl* y el otro romo. Dado que los *primers* comerciales utilizados habitualmente no están fosforilados en los extremos 5', antes de ligar los dos amplicones hay que fosforilar sus extremos romos. Para ello, se usó la enzima T4 polinucleótido quinasa, que cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP a un grupo -OH libre en posición 5' de una molécula de ADN, ARN u oligonucleótido.

Finalmente, se transformaron por choque térmico bacterias con el producto de reacción, se sembraron en placas de agar suplementadas con el antibiótico de selección correspondiente y se crecieron clones en medio líquido. Se purificó el ADN plasmídico de cada uno de los cultivos y su identidad se comprobó en primer lugar con un estudio de restricción y, a continuación, por secuenciación.

3.6. CULTIVOS CELULARES

Soluciones utilizadas

- Tampón fosfato salino (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄ y 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4.
- Solución de tripsina: 2,5 g/l de tripsina de páncreas porcino, 20 mM EDTA, disueltos en PBS.

Los medios de cultivo utilizados para cada tipo celular fueron los siguientes:

- Células Alexander, Caco-2, HepG2 y LS174T: 10 g/l de MEM que contenía sales de Eagle, aminoácidos no esenciales y 2 mM L-glutamina, suplementado con 1 mM piruvato sódico y 26,2 mM bicarbonato sódico. La sublínea resistente al cisplatino LS174T/R se creció en presencia de 10 µM de este fármaco.
- Células CHO: 10 g/l de DMEM que contenía 5,5 mM glucosa y 4 mM L-glutamina, suplementado con 44 mM bicarbonato sódico, 25 mM HEPES y 434 µM L-prolina. En el medio de cultivo de las sublíneas establemente transfectadas CHO-OATP1B1 y CHO-OATP1B3 se añadió 0,5 mg/ml de geneticina G-418.

El PBS, la solución de tripsina y los medios base se filtraron con un filtro de 0,2 µm de tamaño de poro.

Los medios base se suplementaron con 10% de FBS inactivado y 1% de una mezcla de antibióticos y antimicótico. La inactivación del FBS se realizó a 56°C durante 30 min.

3.6.1. CULTIVO, PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS

Las células se obtuvieron y conservaron a partir de las células originarias mediante multiplicación y posterior congelación. Las células se congelaron en N₂ líquido suspendidas en FBS con 10% DMSO, sometiénolas a una bajada gradual de temperatura. Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N₂ líquido en el que se almacenaban, los criotubos que las contenían se descongelaron en condiciones de esterilidad a 37°C. Una vez descongeladas, las células se sembraron en placas o frascos Roux, se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente y se introdujeron en la estufa de incubación manteniéndolas a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ humidificada.

El crecimiento de las células se produjo tras su adhesión a la superficie de la placa o frasco. Las células se desprendían de la superficie de cultivo mediante tripsinización, siguiendo las instrucciones del proveedor. Para ello, se incubaban con una solución de tripsina y se recogían sobre medio de cultivo por aspiración. Las células tripsinizadas se centrifugaban a 300 *xg* durante 5 min para precipitarlas, se resuspendían en el medio de cultivo correspondiente y se determinaba su viabilidad mediante el test del azul de Tripán.

3.6.2. ESTUDIOS DE TOXICIDAD Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, con 100 µl de medio cultivo/pocillo, a una densidad variable según la línea celular y el tiempo de incubación requerido en cada ensayo (Tabla MM-7).

Transcurridas 24 h tras la siembra, a excepción de las células Caco-2 para las cuales se dejaba un periodo de tiempo de 48 h, se añadieron los compuestos a ensayar disueltos en medio de cultivo fresco a diferentes concentraciones. Los efectos tóxico y antiproliferativo se evaluaron tras 6 h y 72 h, respectivamente, de exposición de las células tumorales a los compuestos. La viabilidad celular se determinó por el test de formazán (apartado 3.12.3.).

Tabla MM-7. Densidad celular de siembra (número de células por pocillo) en función de la línea celular y el tiempo de incubación requerido para cada ensayo.

| Línea celular | Efecto tóxico (6 h) | Efecto antiproliferativo (72 h) |
|---------------|---------------------|---------------------------------|
| Alexander | 10.000 | 5.000 |
| HepG2 | 25.000 | 15.000 |
| LS174T | 40.000 | 15.000 |
| Caco-2 | 25.000 | 15.000 |

3.6.3. TRANSFECCIÓN CON LÍPIDOS CATIÓNICOS

La adquisición de un transgén por parte de las células de manera transitoria implica que el plásmido recombinante adquirido es extracromosómico y se pierde durante la división, ocurriendo una expresión transitoria del gen de interés. En este trabajo, las transfecciones transitorias de las líneas celulares se llevaron a cabo con Lipofectamina LTX y reactivo Plus. El reactivo Lipofectamina contiene lípidos catiónicos que en una solución acuosa forman liposomas que encapsulan las moléculas de ADN cargadas negativamente (Dalby, 2004). La función del reactivo Plus es unirse a las moléculas de ADN favoreciendo la posterior formación de los liposomas.

En trabajos previos de nuestro grupo se determinaron las condiciones óptimas para realizar la transfección de las líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral; es decir, la mezcla catiónica lipídica que conseguía mayor eficacia de transfección y menor toxicidad sobre las células. Se ensayaron diferentes proporciones de lípidos catiónicos:ADN, variando la cantidad de ADN. El ADN empleado fue un plásmido que contenía la ORF de la luciferasa de luciérnaga y la eficacia de transfección se evaluó en función del nivel de luz emitida por las células. Las células Alexander se transfectaron 24 h después de la siembra con complejos lípido-ADN que contenían 4,5 μ l de Lipofectamina por cada μ g de ADN. Las células LS174T se transfectaron 48 h después de la siembra con complejos lípido-ADN que contenían 4 μ l de Lipofectamina por cada μ g de ADN. En ambos casos, transcurridas 24 h de incubación se aspiró el medio para retirarlos y se añadió medio de cultivo fresco.

El protocolo que se siguió en las transfecciones celulares consistió en diluir la cantidad de ADN óptima para cada línea celular en el volumen de medio Opti-MEM adecuado en función de las dimensiones de la superficie en la que crecían las células. Posteriormente, se añadió 1 μ l de reactivo Plus por cada μ g de ADN. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió la Lipofectamina en la proporción

óptima para cada tipo celular y tras agitar la mezcla e incubarla durante 30 min a temperatura ambiente, se añadió el volumen correspondiente sobre el medio de cultivo fresco que previamente se había añadido a las células.

Se llevó a cabo un diseño experimental diferente para cada tipo de experimento realizado.

Transfección para estudios de expresión génica

Para determinar la expresión de genes en las distintas líneas celulares, las células se sembraron en placas de 6 pocillos de 3 cm de diámetro en un volumen final de 2 ml/pocillo, a una densidad celular adecuada en función de la línea celular. Se transfectaron a las 24 h. Se usaron como control células transfectadas con el vector “vacío” pcDNA3.1/Hygro(+). El tratamiento con el agente inductor del promotor de MRP2, dexametasona, se inició 48 h después de la transfección. Las células usadas como control fueron tratadas con la misma concentración de DMSO que el añadido en los pocillos problema. Tras el tiempo de incubación correspondiente a cada experimento, las células se tripsinizaron para extraer el ARN total.

Transfección para estudios de inmunofluorescencia y Western blot

Se sembraron células sobre cubres estériles en placas de 24 pocillos para estudiar la localización subcelular de una proteína por inmunofluorescencia y en placas de 6 pocillos para analizar su expresión por Western blot, a una densidad celular y a las condiciones de transfección celular adecuadas a cada línea celular. La inmunofluorescencia y la recogida de lisados celulares para Western blot se llevaron a cabo a partir del segundo día tras la transfección.

Transfección para estudios de actividad antiproliferativa

Las células se sembraron en placas de 6 cm de diámetro. Se transfectaron a las 24 h. Tras 48 h de incubación las células se tripsinizaron y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5000 células por pocillo. La exposición a los agentes citostáticos y determinación de la viabilidad se llevó a cabo de la misma forma que para estudiar la actividad antiproliferativa en células no transfectadas.

3.7. DETERMINACIÓN DEL ARNm POR RT-PCR CUANTITATIVA

3.7.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

El aislamiento del ARN total de células tumorales humanas en cultivo se hizo usando los reactivos y el material proporcionado en el kit comercial “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit” (GE Healthcare), de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Se partía de un número de células no superior a 5×10^6 . Las células precipitadas se mezclaban con un tampón de lisis que inactivaba las ARNasas, asegurando de esta manera la integridad del ARN durante el proceso de extracción. A continuación, se añadía etanol para proporcionar las condiciones adecuadas de retención del ARN en la membrana de sílice de las columnas sobre las que se aplicaban las muestras. El ADN adsorbido en la membrana se eliminaba por tratamiento con DNasa I y la purificación se completaba con pasos de lavados y centrifugaciones. El ARN total se eluía en agua libre de ARNasas.

La extracción del ARN de bacterias sometidas a unas determinadas condiciones experimentales, se hizo sobre una muestra de 0,5 ml de cultivo bacteriano que se diluyó a una densidad óptica de 0,09 UA a λ de 600 nm e inmediatamente se mezcló con 1 ml del reactivo “RNAprotect Bacteria Reagent” que permitía la estabilización del ARN. Tras una incubación breve, se siguió el protocolo del kit “RNeasy Mini Kit” (Qiagen) basado en la lisis enzimática y digestión bacteriana usando lisozima y proteinasa K. Finalmente, el ARN se purificó en columna.

El ARN extraído se cuantificó por espectrofotometría a una λ de 260 nm. Su integridad se determinó mediante la visualización de forma nítida y localizada de las bandas del ARNr 18S y 28S en el caso de células eucariotas y del ARNr 16S y 23S en el caso de bacterias en un gel de agarosa desnaturalizante al 1% sometido a electroforesis.

3.7.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

La RT permite generar ADNc a partir de ARN para ser utilizado como molde en la PCR posterior. Se usaron los reactivos proporcionados en el kit comercial “SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen), que incluía la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) y un tampón de reacción que

contenía, entre otros, *random primers*. En cada reacción se añadieron 2 µg de ARN total que sirvió como molde de acción enzimática.

3.7.3. ELIMINACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO DE LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS

La enzima *DpnI*, aislada del microorganismo *Diplococcus pneumoniae*, reconoce de forma específica secuencias de ADN GATC metiladas en la adenina, presentes de forma frecuente en el ADN plasmídico de procedencia bacteriana, pero no en el ADNc producido en la reacción de RT. Dado que en el proceso de extracción y purificación del ARN total se arrastraban moléculas de los plásmidos internalizados en las células con la transfección transitoria, para evitar la distorsión al alza de la cuantificación de la expresión génica en la PCR, se decidió hacer un tratamiento con la enzima de restricción *DpnI* de este tipo de muestras una vez concluida la RT.

Teniendo en cuenta el mecanismo de acción de esta enzima, en la reacción de PCR posterior se usaron unos *primers* que delimitaron un amplicón que contenía al menos un sitio de corte para *DpnI* y así, se consiguió cuantificar únicamente el ARNm transcrito a partir de los plásmidos transfectados, realizando una medida más exacta.

3.7.4. PCR CUANTITATIVA

Para determinar los niveles de expresión de genes se utilizó la PCR cuantitativa a tiempo real, una variante de la PCR analítica (Kubista, 2006). Esta técnica permite cuantificar de forma absoluta o relativa el producto amplificado en la reacción durante la fase exponencial del proceso mediante la detección de fluorescencia.

Como fluorocromo se eligió el SYBR Green I, un componente de la mezcla de reactivos “Power SYBR Green PCR Master Mix” utilizada. En la Tabla MM-8 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm de las diferentes proteínas estudiadas en esta Tesis Doctoral, que se diseñaron como se describió en el apartado 3.4.1.

Las condiciones de temperatura en la PCR fueron 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C y, por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 s a 95°C y de 1 min a 60°C. Al finalizar la reacción de PCR, las muestras se calentaron en el termociclador desde 60 a

95°C, mientras que se monitorizó la fluorescencia, para obtener las curvas de desnaturalización del ADN amplificado.

La abundancia del ADN problema se normalizó por la expresión del gen de la GAPDH, en células eucariotas, o del ARNr 16S, en bacterias, determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se realizaron por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua ultrapura.

Tabla MM-8. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm por RT-PCR cuantitativa.

| Proteína | Gen | Primer forward (5'–3') | Primer reverse (5'–3') | Amplicón (pb) | Número de acceso |
|----------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------|---------------------|
| DinI | <i>dinI</i> | GGCGAACTTTCCCGC CGTAT | CTGGAGAATTTGCTA ATGCGCTGTTT | 138 | NC_012971 |
| LexA | <i>lexA</i> | GGCCAGGCAACAAGA GGTGT | CTTCAGATGTTCTTCA GCCGCGTT | 130 | NC_012971 |
| RecA | <i>recA</i> | CAGCACTGGGCCAGA TTGAGA | CCCAAGCGCGATATC CAGTGAAA | 122 | NC_012971 |
| UmuC | <i>umuC</i> | GTTTTATGCCAGCTGT GAGACGGT | CACCACAGCGACGAA ACAGATCTT | 173 | NC_012971 |
| ARNr 16S | <i>ARNr 16S</i> | CACGAGGGTTCAGCT GTCTCT | TCTCGTCTTGCTGTGT CATGC | 83 | AJ842751 |
| OATP1B1 | <i>SLCO1B1</i> | TGCAATGGATTGAAGA TGTTCTTGCA | GCAAATTTCCAATTC AAAGCTTCCGTC | 166 | NM_006446 |
| OATP1B1 | <i>SLCO1B1</i> (+ <i>Dpnl</i>) | TGCAATGGATTGAAGA TGTTCTTGCA | CAACCTTTTCCCCTA TCTCAGG | 416 | NM_006446 |
| OATP1B3 | <i>SLCO1B3</i> | AGATTGTGTAAGGAA TCTGGGTCACA | AGTGCAAAGCCAATGA CTGGAC | 198 | NM_019844 |
| GAPDH | <i>GAPDH</i> | TGAGCCCGCAGCCTC C | TACGACCAAATCCGTT GACTCC | 138 | NM_002046 |

3.7.5. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS RESULTADOS

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación del ciclo umbral (Ct). Se utilizó un control endógeno (GAPDH o ARNr 16S) como elemento normalizador para establecer una relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno y obtener un valor de Ct normalizado del gen diana. De esta manera se consiguió normalizar la cantidad de ADN añadido a la reacción y corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Los resultados normalizados se expresaron

como porcentaje respecto a la abundancia del gen diana en muestras donde su expresión fue alta y fácilmente detectable (calibrador) y cuyos niveles se consideraron del 100%.

La expresión del gen diana, normalizada frente al control endógeno, y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$,

y ΔCt como $Ct \text{ diana} - Ct \text{ control endógeno}$.

3.8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.8.1. INMUNODETECCIÓN

Las células sembradas en cubreobjetos estériles dentro de los pocillos de placas de cultivo tal y como se indica en el apartado 3.6.3, se fijaron con metanol frío durante 1 min y, tras tres lavados rápidos con PBS, fueron incubadas con FBS al 5% en PBS durante 30 min para bloquear los sitios de unión inespecífica. Seguidamente se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo primario frente a V5 obtenido en ratón diluido 1:800 en PBS con 5% de FBS. A continuación, las preparaciones se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 1 h en oscuridad con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor-488 (diluido 1:1000) y DAPI para teñir los núcleos (diluido 1:5000). Tras tres lavados con PBS, se aplicó el medio de montaje para fluorescencia sobre el cubreobjetos y se selló con laca de uñas sobre el portaobjetos. La visualización del marcaje se realizó con un microscopio confocal.

3.8.2. MICROSCOPIA CONFOCAL

Tras el inmunomarcaje, las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Leica SP5. La detección del marcaje de los anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor-488 se realizó a una λ de excitación de 488 nm utilizando un láser de argón y un filtro de fluorescencia de emisión 499-582 nm. Para el DAPI se utilizó el láser Diodo 405, con una λ de excitación de 405 nm y un filtro de emisión de 416-480 nm.

3.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Soluciones utilizadas

- Tampón RIPA: 1% IGEPAL CA-630, 0,5% desoxicolato sódico y 0,1% SDS disueltos en PBS.
- Solución de carga Laemmli 2x: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol.
- Tampón de migración: 25 mM Tris, 192 mM L-glicina y 1% SDS.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM L-glicina y 20% metanol.
- Rojo Ponceau: 0,1% Ponceau S en 5% ácido acético.
- Tampón fosfato salino (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4 y 1,5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4.
- PBS-T: PBS suplementado con 0,5% de Tween-20.

3.9.1. OBTENCIÓN DE LISADOS DE CÉLULAS HUMANAS

Las células se sembraron y transfectaron tal y como se describió en el apartado 3.6.3. Transcurrido el tiempo correspondiente después de la transfección, se tripsinizaron y se precipitaron por centrifugación y tras un lavado con PBS, se resuspendieron en tampón RIPA suplementado con 1% de un cóctel de inhibidores de proteasas y permanecieron en incubación durante 30 min a 4°C. Finalmente, el lisado celular se centrifugó a 20.000 xg durante 20 min a 4°C; se recogió el sobrenadante y se conservó a -80°C hasta su uso.

3.9.2. PREPARACIÓN DE LOS GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA

El gel de resolución se preparó mezclando 2,4 ml del tampón Tris 1,5 M pH 8,8, 0,4 ml de SDS 10%, 5 μl de TEMED, 20 μl de persulfato de amonio 25%, la cantidad adecuada de poliacrilamida según el porcentaje del gel y agua hasta un volumen de 10 ml. La mezcla se depositó en un soporte previamente montado del sistema "Mini-Protean II Cell" y se dejó polimerizar durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se protegió del aire añadiendo isopropanol saturado en agua.

Una vez polimerizado el gel, se retiró el isopropanol y la superficie del gel en contacto con el aire se lavó con agua destilada. Se preparó entonces el gel

concentrador con un porcentaje de poliacrilamida del 4% mezclando 1 ml del tampón Tris 0,5 M pH 6,8, 160 µl del SDS 10%, 6 µl de TEMED, 12,5 µl de persulfato de amonio 25%, poliacrilamida y agua hasta un volumen de 4 ml. Se depositó sobre el gel separador y se introdujo el peine, dejándolo polimerizar a temperatura ambiente.

3.9.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras la cuantificación de la concentración de proteínas en las muestras por el método de Markwell (apartado 3.12.1.), se procedía al procesamiento de dichas muestras mezclándolas con un volumen del tampón de Laemmli 2x. Seguidamente se incubaron durante 3 min en un baño de agua hirviendo o no se hirvieron dependiendo de la naturaleza de la proteína de interés y se centrifugaron 1 min a 20.000 *xg*. La cantidad de proteína total de cada tipo de muestra cargada en las calles de un mismo gel varió entre 5 y 50 µg.

3.9.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Tras cargar las muestras en las calles correspondientes del gel de poliacrilamida, se llevó a cabo la electroforesis vertical en una cubeta con tampón de migración, a una corriente constante de 10 mA para el gel concentrador, incrementándose a 20 mA para el gel separador o de resolución.

3.9.5. TRANSFERENCIA A UNA MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Terminada la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en una cubeta con tampón de transferencia, a una corriente de 250 mA durante 90 min a 4°C y en agitación constante.

Para comprobar que las proteínas se encontraban en la membrana tras la transferencia, ésta se tiñó con colorante rojo Ponceau durante 5 min. Esta tinción también permitía estimar la uniformidad de la carga de proteínas en cada calle del gel.

3.9.6. INMUNODETECCIÓN

Sobre la membrana se llevó a cabo un bloqueo con leche descremada al 5% en PBS-T durante 1 h en agitación a temperatura ambiente.

A continuación, se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación con un anticuerpo primario frente a V5 obtenido en ratón diluido 1:800 en leche descremada al 1% en PBS-T. Tras lavar la membrana con PBS-T (4 lavados de 15 min en agitación), se incubó durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado marcado con peroxidasa y diluido en leche descremada al 5% en PBS-T. A continuación, se procedió de nuevo al lavado de la membrana con PBS-T en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Finalmente, la membrana se incubó brevemente con los reactivos de detección ECL (“Enhanced Chemioluminescence”) y se llevó a cabo el revelado de la misma en un analizador de imagen LAS-4000 (Fujifilm), durante el tiempo necesario para encontrar una señal detectable con el menor ruido de fondo.

3.10. PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

Soluciones utilizadas

- Medio de cultivo de células HEK-293T: 10 g/l de DMEM que contenía 25 mM glucosa y 26,2 mM bicarbonato sódico, suplementado con 2 mM GlutaMAX, 10% de FBS inactivado y 1% de una mezcla de antibióticos y antimicótico.
- Polietilenimina (PEI): 1 mg PEI/ml, 25 mM HEPES y 150 mM NaCl; pH 7,5.

3.10.1. FUNDAMENTO

Para generar lentivirus recombinantes defectivos, es necesario sustituir los genes de las proteínas virales por el transgén en el plásmido genómico lentiviral. En la producción de los virus se tiene que usar una línea celular (célula empaquetadora) que se transfecta con los dos plásmidos que codifican las proteínas estructurales de los lentivirus y con el plásmido recombinante que contenga el ADN de interés, flanqueado por los LTR y por la señal de empaquetamiento, además de otros elementos necesarios en *cis* como el *primer binding site*, y el tracto polipurínico necesario para la síntesis de la segunda cadena. De esta manera se generarán partículas retrovirales recombinantes y

defectivas, que pueden ser purificadas y concentradas a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (Kuroda, 2009).

3.10.2. PRODUCCIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

Se utilizaron las células HEK-293T como células empaquetadoras, que se sembraron a subconfluencia en placas de 10 cm de diámetro recubiertas de colágeno con 10 ml del medio de cultivo. Se incubaron a 37°C durante 8 h en atmósfera de 5% de CO₂ humidificada. A continuación, se transfectaron utilizando el método de la PEI con 3 tipos de plásmidos: i) los vectores de transferencia pWPI-prMRP2-OATP1B1 o pWPI-prBIRC5-OATP1B3, que contenían tanto el gen *reporter* EGFP como los genes que codifican OATP1B1 u OATP1B3, o el plásmido pWPI que solamente codificaba la EGFP y se utilizó en la producción de virus vacíos (control); ii) el plásmido psPAX2, que codifica proteínas estructurales, y iii) el vector de expresión pMD2.G que codificaba la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular.

Para formar los complejos PEI:ADN se mezclaban 6 µg del plásmido psPAX2, 4,5 µg del plásmido pMD2.G y 6 µg del plásmido de transferencia, disueltos en 1,2 ml de solución salina (150 mM NaCl), con 60 µl de PEI. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió a la placa de cultivo de células HEK-293T. A las 24 h se retiró el medio de cultivo con los complejos PEI:ADN y se añadió medio fresco.

Se recogieron sobrenadantes de las placas de cultivo a las 48 h, 56 h y 72 h después de la transfección, que se filtraron a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro, para eliminar las células. Las partículas virales se concentraron por ultracentrifugación a 53.000 xg durante 120 min a 16°C. El precipitado se resuspendió en 200 µl de medio RPMI y se guardó a -80°C hasta su uso.

3.10.3. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL

El título viral se determinó infectando células HEK-293T con diluciones seriadas de la solución viral y, posteriormente, analizando el porcentaje de células GFP positivas por citometría de flujo (apartado 3.11.).

Las células HEK-293T se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas de colágeno, a una densidad celular de 125.000 células/pocillo con 0,5 ml del medio adecuado. A las 24 h se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco que contenía 8 µg/ml de polibreno, un compuesto que forma agregados de partículas virales y favorece su interacción con las células diana. Seguidamente, se añadieron distintos volúmenes de la solución viral en cada pocillo y la placa se centrifugó a 1.800 xg durante 90 min a 32°C. A las 24 h se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco. A los 4 días tras la transducción, se determinó el número de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

La concentración de partículas virales se calculó por la fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ células sembradas} \times \% \text{ células positivas} \times 10}{\text{Volumen de virus } (\mu\text{l})} = \left(\frac{\text{virus}}{\text{ml}} \right)$$

3.10.4. DETERMINACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN (MOI) Y CONDICIONES DE TRANSDUCCIÓN ÓPTIMAS

MOI es la relación entre el número de partículas virales y el número de células diana presentes en un cultivo. Para cada línea celular se determinó la MOI óptima (en la que utilizando la menor cantidad de partículas virales se consigue una transducción eficiente), en células sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad celular adecuada. A las 24 h se infectaron con las MOIs de 10, 25, 50 y 100 utilizando partículas lentivirales pWPI con o sin polibreno, como se describió en el apartado anterior. A los 4 días tras la transducción, se determinó el número de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo (apartado 3.11.).

3.10.5. TRANSDUCCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se infectaron a las 24 h con los lentivirus recombinantes según la MOI óptima para esa línea celular. Para ello, se añadió el volumen correspondiente de la solución viral en los pocillos y la placa se centrifugó a 1.800 xg durante 90 min a 32°C. A las 24 h se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco. A los 4 días tras la transducción, se determinó el número de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo (apartado 3.11.).

Se seleccionaron clones de las células que expresaban establemente la proteína de interés por el método de la dilución límite. Se eligieron aquellos clones que expresaban una mayor cantidad de EGFP, determinada por citometría de flujo, o que tenían un nivel de expresión del transportador de captación, determinado por su capacidad de captación del sustrato fluorescente CGamF.

3.11. ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

3.11.1. FUNDAMENTO

Este método permite la realización de varias medidas simultáneas en células, orgánulos celulares u otras partículas que viajan inmersas en un fluido por el circuito del citómetro de flujo. Estas partículas son alineadas frente a una fuente de luz láser, gracias a la presión ejercida por otro fluido denominado envolvente, de manera que se consigue su paso individual y constante frente a la luz. De este modo es posible recoger la información correspondiente a dos tipos de parámetros, los que reflejan la dispersión de la luz cuando incide sobre una partícula y los relacionados con la emisión de la luz por fluorocromos presentes en dicha partícula, cuando ésta es excitada por el láser.

La citometría de flujo también permite evaluar la funcionalidad de proteínas transportadoras investigando la captación o el eflujo de los fluorocromos cuando las partículas han sido previamente incubadas con ellos, como en el caso de algunos experimentos realizados en esta Tesis Doctoral.

3.11.2. PROCEDIMIENTO

Hemos utilizado la técnica de citometría de flujo para determinar la expresión de EGFP en células infectadas con lentivirus y para cuantificar la captación del análogo fluorescente de un ácido biliar CGamF por células que expresaban la proteína OATP1B1 u OATP1B3. Se usó IP para marcar las células muertas, que se excluyeron del análisis.

Para la detección de estos fluorocromos se utilizó como fuente emisora de luz el láser de argón de λ de 488 nm y los detectores de emisión FL1 (530/30 nm), para la EGFP y el CGamF, y FL3 (670/Long Pass), para el IP. En los análisis de recogieron

datos correspondientes a 5000 eventos como mínimo (células) y se registró la fluorescencia media de la población celular.

Las células que expresaban EGFP a procesar se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se centrifugaron durante 5 min. El precipitado de células se resuspendió en 500 μ l de PBS y la fluorescencia se midió directamente en el citómetro.

Para determinar la captación de CGamF, las células se resuspendieron en 100 μ l de medio de captación que contenía 1 μ M o 10 μ M de sustrato, para evaluar la funcionalidad del OATP1B3 u OATP1B1, respectivamente (Martinez-Becerra, 2011), y 50 μ g/ml de IP. La suspensión celular se incubó durante 15 min a 37°C en oscuridad. A continuación se añadieron 900 μ l de medio de captación enfriado en hielo, para parar los procesos de transporte, y la fluorescencia intracelular se midió en el citómetro de flujo.

3.12. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.12.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La determinación de la concentración de proteínas se hizo siguiendo una modificación del método de Lowry realizada por Markwell (Markwell, 1978) que se basa en la reacción de las proteínas con cobre y tartrato en medio alcalino y la posterior reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles por las proteínas tratadas, formando un compuesto coloreado cuya concentración se determinó por espectrofotometría. Como patrón se utilizó albúmina sérica bovina.

3.12.2. TEST DEL AZUL DE TRIPÁN

El método se basa en que sólo las células vivas son capaces de excluir el colorante azul de Tripán. Para realizar el test, se mezclaron 20 μ l de una suspensión de células y 20 μ l de 0,4% azul de Tripán. Al microscopio se contaron las células en una cámara Thoma. Sólo aquellas que no eran azules eran células viables.

3.12.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POR EL TEST DE FORMAZÁN

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. El MTT produce una solución amarillenta que es convertida a formazán, de color azul oscuro e insoluble en agua, por las deshidrogenasas celulares metabólicamente activas. Los cristales azules de formazán son solubilizados con una solución detergente ácida. La cantidad de formazán producido se puede cuantificar espectrofotométricamente y es directamente proporcional al número de células vivas (Marshall, 1995; Mosmann, 1983).

3.12.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Se utilizó el sistema Steady-Glo de Promega para analizar la actividad luciferasa de luciérnaga expresada en células. El kit comercial incluía un reactivo para lisar las células y luciferina. El kit estaba optimizado para que la señal de luminiscencia decayera lentamente, lo que permitía tomar medidas de luminiscencia a tiempos mayores que con los métodos habituales.

Para medir la actividad de la enzima en células tumorales humanas cultivadas en una placa de 96 pocillos, el medio de cultivo de cada pocillo se reemplazaba por 50 μ l de medio fresco a temperatura ambiente. A continuación, se añadían 50 μ l del reactivo de luciferasa "Steady-Glo". Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se pasaba a una placa de 96 pocillos de plástico negro, para que la luz emitida de unos pocillos no interfiriera la lectura de otros.

Para medir la actividad luciferasa en bacterias se mezclaban 50 μ l de la solución que contenía las bacterias con 50 μ l del reactivo "Steady-Glo" en los pocillos de una placa de 96 pocillos de plástico negro. Una vez añadido el sustrato de la luciferasa, la placa se mantuvo en incubación durante 10 min a temperatura ambiente sobre un agitador de vaivén para que la mezcla se homogeneizara y la señal de luz emitida se estabilizara. Finalmente la luz se visualizaba en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

3.12.5. DETERMINACIÓN DE PLATINO Y CROMO POR ABSORCIÓN ATÓMICA

La pureza de los Bamet sintetizados se determinó por absorción atómica de platino en horno de grafito con una lámpara de cátodo hueco. Para la valoración de las soluciones de los Bamet, las soluciones problema se diluían con HCl 0,02 N y las medidas se hacían sin mineralización previa.

Para determinar la cantidad de cromo en las cenizas se mineralizaron con HCl al 37% durante 24 h a temperatura ambiente. A continuación se calentaron los tubos en un termostato de bloque metálico a 150°C hasta conseguir la sequedad de la muestra y se solubilizaron de nuevo en HCl 0,02 N. Se añadió cloruro amónico a una concentración final de 20 g/l para precipitar el hierro y evitar su interferencia en la medida. Tras su centrifugación, se midió su absorbancia en el espectrómetro de absorción atómica.

3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media \pm la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (EEM). Para calcular la significación estadística de las diferencias entre dos grupos se utilizó el test de *t* de Student para valores apareados y no apareados. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los ajustes de dispersiones de puntos a rectas de regresión se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados.

*Desarrollo de nuevas
herramientas biotecnológicas para
la manipulación de la
quimiorresistencia y como
biosensores de agentes
genotóxicos*



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE GENOTOXICIDAD DE COMPUESTOS ENDÓGENOS Y XENOBIÓTICOS

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético. Los agentes capaces de causar toxicidad genética son denominados genotóxicos y se pueden clasificar de acuerdo a su origen en químicos, biológicos y físicos. Toda acción genotóxica puede ser anulada por la acción de distintos mecanismos celulares de reparación del ADN o por la entrada de las células en apoptosis, o puede derivar en mutagenicidad, carcinogénesis y teratogénesis. Así, conviene resaltar que no todos los genotóxicos son mutágenos, ni carcinógenos; de hecho, existen carcinógenos no genotóxicos que tienen la capacidad de interferir con los mecanismos de reparación del ADN o de incrementar la respuesta mutagénica a otros agentes, de ahí que se les denomine comutágenos.

El daño en el ADN puede ocurrir a nivel de nucleótidos, de hebras del ADN, e incluso a nivel cromosómico y genómico, pudiéndose manifestar a través de distintas alteraciones estructurales, dependiendo del tipo de lesión.

Como consecuencia de la actividad humana y del desarrollo industrial y tecnológico, son muchos los agentes potencialmente genotóxicos, mutágenos y/o carcinógenos que se encuentran frecuentemente contaminando el medio ambiente y los productos empleados en la alimentación humana y ganadera, constituyendo una fuente continua de exposición y, por tanto, un riesgo potencial para la salud humana y del ganado. Esta situación obliga a la adopción de medidas estrictas de control y seguridad, siendo imprescindible, entre otras muchas, la realización de pruebas de determinación de genotoxicidad, mutagenicidad y/o carcinogenicidad de todas las sustancias químicas de uso frecuente.

Son muchos y muy diferentes los ensayos que se han desarrollado hasta el momento. En términos generales, se pueden clasificar en ensayos de mutagenicidad, que incluyen aquellos que valoran tanto un efecto mutagénico directo como la reversión de una mutación; ensayos de genotoxicidad, fundamentalmente basados en la respuesta SOS; y, finalmente, aquellos basados en la observación de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y demás alteraciones estructurales del ADN.

Para poder evaluar la capacidad de diferentes agentes de causar un daño en el ADN, nos planteamos como objetivo de este trabajo diseñar y desarrollar un biosensor

basado en la respuesta SOS bacteriana, con el que llevar a cabo un ensayo de genotoxicidad que resulte aplicable en las áreas ambiental, agroalimentaria y biosanitaria.

4.1.1. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES SOS TRAS LA EXPOSICIÓN A CISPLATINO

El primer paso fue elegir el gen del sistema SOS en el cual fundamentar el funcionamiento del biosensor para la detección de genotoxicidad.

La respuesta SOS (apartado 2.2.2.4.) es un sistema de reparación del ADN bacteriano que se induce ante situaciones de estrés por genotoxicidad e implica la activación de un conjunto de genes (genes SOS) (Michel, 2005) que forman parte de un regulón (Schlacher, 2006). En condiciones normales, el represor LexA se une a la región operadora de los genes SOS reprimiendo su expresión (Michel, 2005). Cuando se produce daño en el material genético, la proteína RecA reconoce el daño en el ADN y pasa a un estado activo donde funciona como coproteasa al promover la autodegradación de LexA (Janion, 2008). En ese estado, LexA no puede unirse al operador de los genes SOS, cuya expresión se induce de manera secuencial en el tiempo. En las etapas iniciales se expresan *lexA* y genes implicados en NER, genes encargados de la reparación del ADN por recombinación, *polB* y *dinB* que codifican para las polimerasas II y IV respectivamente, *dinI*, *recA* y *recN*; y en las últimas etapas de la inducción *sfiA* y los genes *umuC* y *umuD* (Kuzminov, 1999). DinI en presencia del nucleofilamento ADN-RecA inhibe la activación de la polimerasa V (UmuD₂C), que se encarga de iniciar la reparación del ADN con baja eficiencia pudiendo dar lugar a la aparición mutagénesis (Yasuda, 1998) (Janion, 2008).

En base al conocimiento de la respuesta SOS, se eligieron los genes *recA*, *lexA*, *dinI* y *umuC* para analizar por RT-PCR cuantitativa su patrón de expresión en bacterias *E. coli* BL21(DE3) crecidas durante 2,5 h en condiciones normales y en presencia de 50 µM de cisplatino para generar estrés genotóxico. El mecanismo de acción del cisplatino es bien conocido, ya que forma aductos cisplatino:ADN a través del establecimiento de puentes intra- e intercatenarios entre guaninas adyacentes del ADN (Rozenzweig, 1977). La concentración de cisplatino utilizada se seleccionó tras comprobar que no afectaba al crecimiento de las bacterias durante el tiempo de incubación (dato no mostrado).

Como cabía esperar, el tratamiento con cisplatino indujo significativamente la expresión de los principales genes reguladores del sistema SOS, *lexA* y *recA*, siendo mayor el cambio observado para *recA*. Sin embargo, no se observaron cambios de expresión de los genes *dinI* y *umuC* respecto a los niveles de ARNm detectados en las condiciones control (Figura 1)

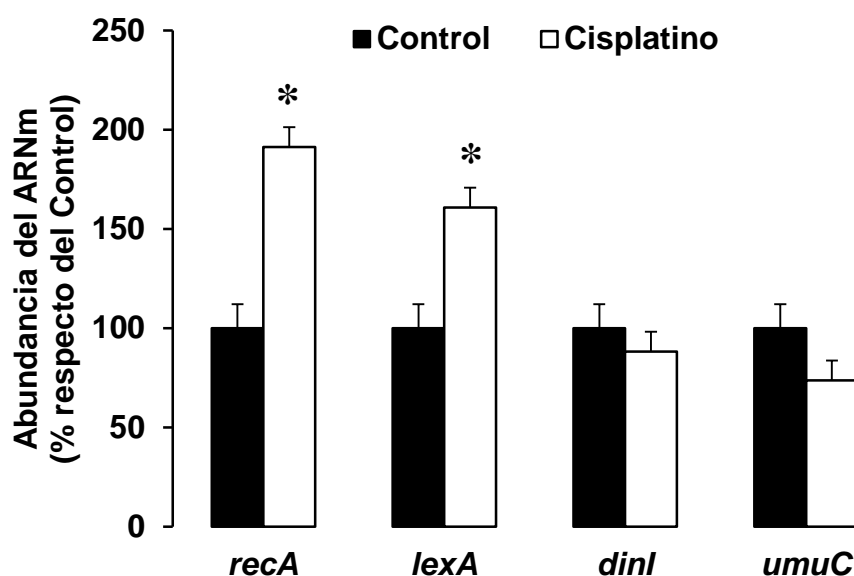


Figura 1. Niveles relativos de ARNm de *recA*, *lexA*, *dinI* y *umuC* en bacterias *E. coli* BL21(DE3) crecidas en condiciones normales (Control) y en presencia de 50 μ M de cisplatino durante 2,5 h, determinados por RT-PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del Control y representan la media \pm SD de un duplicado de tres cultivos bacterianos. *, $p < 0,05$, comparado con el Control por el test *t* de Student.

En nuestras condiciones experimentales la regulación de la respuesta SOS se corresponde con la inducción de los genes *recA* y *lexA*, y no de los genes *dinI* y *umuC* probablemente por la etapa de la respuesta SOS correspondiente al tiempo al que se tomó la muestra del cultivo bacteriano tras su incubación, teniendo en cuenta que la expresión de los distintos genes SOS se produce de manera secuencial en el tiempo.

En cualquier caso, puesto que la mayor inducción génica en respuesta al daño en el ADN tras 2,5 h de incubación con cisplatino ocurría en *recA*, se trata de uno de los genes que se expresan en etapas más tempranas tras la inducción de la respuesta SOS y la proteína para la que codifica es la primera que se activa ante la detección de un daño en el ADN, se eligió RecA como el elemento biológico en el que fundamentar el funcionamiento del biosensor que se iba a desarrollar.

4.1.2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2

Queríamos diseñar un biosensor que nos indicase la presencia de daño en el ADN mediante la activación *in vitro* de RecA. Como receptor biológico del biosensor que porta dicha proteína elegimos la bacteria *E. coli* por ser el prototipo de organismo procariota más estudiado y mejor caracterizado a nivel biológico y genético. En cuanto al transductor, tenía que ser capaz de convertir la señal biológica de activación de RecA en una señal cuantificable, para lo cual decidimos fusionar el promotor del gen *recA* a un gen *reporter* y, en ese caso, elegimos el que codifica para la luciferasa de luciérnaga.

En primer lugar, se clonó un vector de expresión que contenía el promotor del gen *recA* (prRecA) seguido de la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga (*Luc2*). Se llevó a cabo por recombinación Multisite Gateway, que permite la transferencia direccional de varios fragmentos de ADN entre diferentes vectores en un único ensayo, como se comentó en detalle en la sección de Material y Métodos. El proceso se inició con la amplificación del prRecA por PCR de alta fidelidad usando dos oligonucleótidos cebadores que se diseñaron utilizando como molde la secuencia NC_000913 del gen *recA* publicada en la base de datos GenBank. Elegimos una región que contenía 110 pb aguas arriba del codón de inicio de *recA*, que asumimos contendría el promotor (Figura 2). El siguiente paso del proceso de clonación fue la reacción de recombinación BP entre el prRecA flanqueado por sitios *attB* y el vector donador pDONR221 P1-P5r, que contenía sitios *attP*. El clon pEntry resultante se recombinó con otro pEntry que contenía la secuencia codificante de *Luc2* y el vector de destino pcDNA6.2-V5-pL-DEST mediante una reacción LR Multisite. El vector de expresión final que obtuvimos, y que denominamos pcDNA6.2-prRecA-Luc2, aparece representado esquemáticamente en la Figura 2.

El plásmido clonado contenía el promotor del gen *recA* seguido de la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga, además de genes de resistencia a antibióticos que se usan como agentes de selección, tanto para procariotas (ampicilina) como para eucariotas (blastidina), los orígenes de replicación necesarios para su amplificación en bacterias, y sitios *attB* para recombinación Gateway (Figura 2).

El último paso del desarrollo del biosensor requería la transformación de bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) con el plásmido pcDNA6.2-prRecA-Luc2 y su crecimiento en condiciones de selección para obtener el biosensor microbiano prRecA-Luc2.

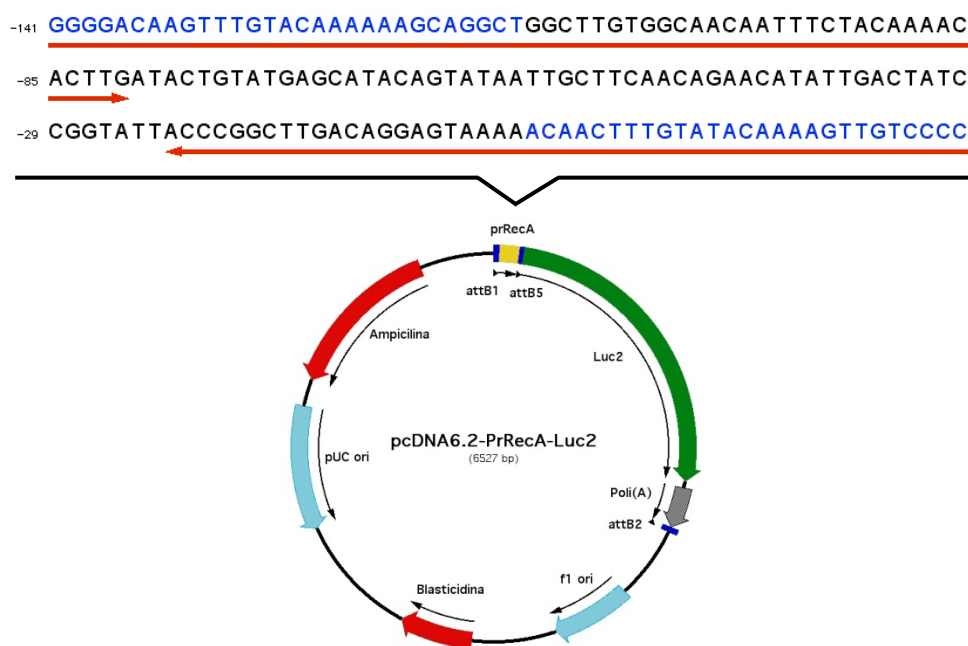


Figura 2. Secuencia de nucleótidos correspondiente a la región del promotor del gen *recA* (prRecA) clonada (parte superior de la imagen), en la que se indica con flechas en color rojo la secuencia, posición y dirección de los cebadores usados para la amplificación de este promotor por PCR de alta fidelidad y en color azul aparecen señalados los nucleótidos que forman parte de los adaptadores *attB* incorporados a la secuencia tras su amplificación. Representación esquemática del vector de expresión obtenido por clonación por recombinación Gateway (parte inferior de la imagen), que contenía el prRecA controlando la expresión de la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga (*Luc2*). En color rojo aparecen representados los genes de resistencia a antibióticos, en azul claro los orígenes de replicación y en azul oscuro las secuencias adaptadoras *att*.

Por tanto, el biosensor microbiano prRecA-Luc2 va a estar constituido por bacterias *E. coli* BL21(DE3) modificadas genéticamente como receptor biológico, ya que aportan el entorno celular adecuado para que las proteínas RecA endógenas actúen como elemento de reconocimiento de fragmentos de ADN de cadena sencilla originados al dañarse el material genético. El vector de expresión pcDNA6.2-prRecA-Luc2 constituye el transductor de este biosensor. Así, cuando las proteínas RecA detecten un daño en el ADN, se producirá la inducción del sistema SOS y, por tanto, una mayor actividad transcripcional del prRecA, tanto del gen endógeno como del que forma parte del transductor, lo cual se traducirá en una mayor emisión de luz originada por la actividad de la luciferasa codificada por el propio transductor.

Teniendo en cuenta la clasificación de los biosensores en función del sistema de transducción, se trata de un biosensor óptico, que se puede clasificar como biosensor de bioluminiscencia de acuerdo a la propiedad óptica que es modificada. En función del

elemento génico de regulación fusionado al gen *reporter*, este biosensor se puede incluir en el grupo de los semi-específicos por tratarse de un promotor de un gen de respuesta a estrés.

El hecho de que el ensayo que se va a llevar a cabo con el biosensor prRecA-Luc2 esté basado en un análisis *in vitro* de la genotoxicidad, evita tener que recurrir a técnicas de extracción, aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos o proteínas que incrementan la complejidad del proceso. Además, el uso de microorganismos para desempeñar la función de receptores biológicos del biosensor presenta ventajas frente a la utilización de células eucariotas, que ya fueron enumeradas en el apartado de Introducción. Por otra parte, la incorporación del transductor en el interior celular a través de la modificación genética del organismo, evita tener que aplicar técnicas de inmovilización del elemento de reconocimiento para favorecer su asociación con el transductor, las cuales pueden interferir con la actividad celular, dando lugar a anomalías en el funcionamiento del biosensor.

4.1.3. PUESTA A PUNTO DE LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2

La bioluminiscencia generada por la luciferasa de luciérnaga es el resultado de una reacción química en la que la luciferina, que es un benzotiazol, es oxidada en presencia de ATP, O₂ y Mg²⁺ para dar lugar a oxiluciferina, CO₂, AMP y luz que deriva del estado electrónicamente excitado de la oxiluciferina producida. Se trata de una reacción que transcurre con rapidez y la luz generada tiene una vida media de solo unos min. De esta manera, para medir la actividad luciferasa del biosensor microbiano prRecA-Luc2 hay que añadir el sustrato de la luciferasa y medir la emisión de luz en un corto período de tiempo. Con este fin se utilizó la mezcla de reactivos “Steady-Glo Luciferase Assay System” (Promega), que además de incluir la luciferina y otros componentes necesarios para la reacción, está optimizada para que la señal de luminiscencia decaiga lentamente, lo que permite tomar medidas de luz a tiempos mayores que con los métodos habituales, asegurando una vida media de la luz de 5 h aproximadamente y máxima eficiencia y reproducibilidad en las medidas.

Para la puesta a punto de la medida de la actividad luciferasa del biosensor microbiano prRecA-Luc2 se optimizaron distintos parámetros del procesamiento, tal y como se describe en los apartados siguientes.

4.1.3.1. VOLUMEN DE PROCESAMIENTO DEL CULTIVO DE BACTERIAS

Para analizar la estabilidad de la señal de luz basal emitida por el biosensor microbiano prRecA-Luc2 durante su medida, se procesaron diferentes volúmenes (50 μ l, 500 μ l y 1000 μ l) del cultivo en fase de crecimiento exponencial de bacterias *E. coli* BL21(DE3) constituyentes del biosensor. Las muestras se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo y resuspender el precipitado de bacterias en medio DMEM, que se utiliza habitualmente en el cultivo de células de mamífero y que es compatible con los reactivos de luciferasa, según lo indican las instrucciones del producto. A continuación, las bacterias se sonicaron para lisarlas con el fin de favorecer la interacción de la luciferasa con su sustrato, incorporado posteriormente al medio. Finalmente, se midió la señal de luz emitida por el biosensor en un rango amplio de tiempo.

Cuando se procesó 1 ml del biosensor microbiano prRecA-Luc2, el volumen más elevado (Figura 3A), la señal de luz emitida se incrementó progresivamente a lo largo del tiempo alcanzando un máximo en el minuto 180 aproximadamente desde el inicio de la medida y, a partir de ahí, comenzó a decrecer. Este aumento de la intensidad de luz observado indicaba que la señal obtenida no era estable, lo cual podría deberse a que el número de bacterias procesadas era tan alto que la sonicación no resultaba suficiente para conseguir una lisis completa de las mismas. Así, a medida que transcurría el tiempo de medida, por la acción detergente de algunos de los componentes que contiene la mezcla de reactivos con la que se incubaba la muestra, se fue completando la lisis bacteriana, produciéndose de manera gradual la liberación de la luciferasa al medio que contenía los sustratos de la reacción y el consecuente aumento de la señal de luz observado.

Por el contrario, procesando volúmenes menores de 500 μ l (Figura 3B) y 50 μ l (Figura 3C y 3D) del biosensor microbiano prRecA-Luc2, aunque se observó una tendencia de aumento de la señal de luz entre los dos primeros tiempos de medida, ésta disminuía lentamente a lo largo del tiempo (Figuras 3B y 3C). Sin embargo, reduciendo el intervalo de medida a los 40 min posteriores al inicio de la reacción, se observó que la tendencia de aumento de la señal de luz que reflejaba cierta inestabilidad ocurría en los 10 primeros min de la reacción (datos no mostrados), mientras que la intensidad de luz se mantenía prácticamente estable en el período de tiempo comprendido entre los minutos 10 y 40 posteriores al inicio de la reacción, tal y como aparece reflejado en la Figura 3D obtenida tras el procesamiento de un volumen de 50 μ l del biosensor.

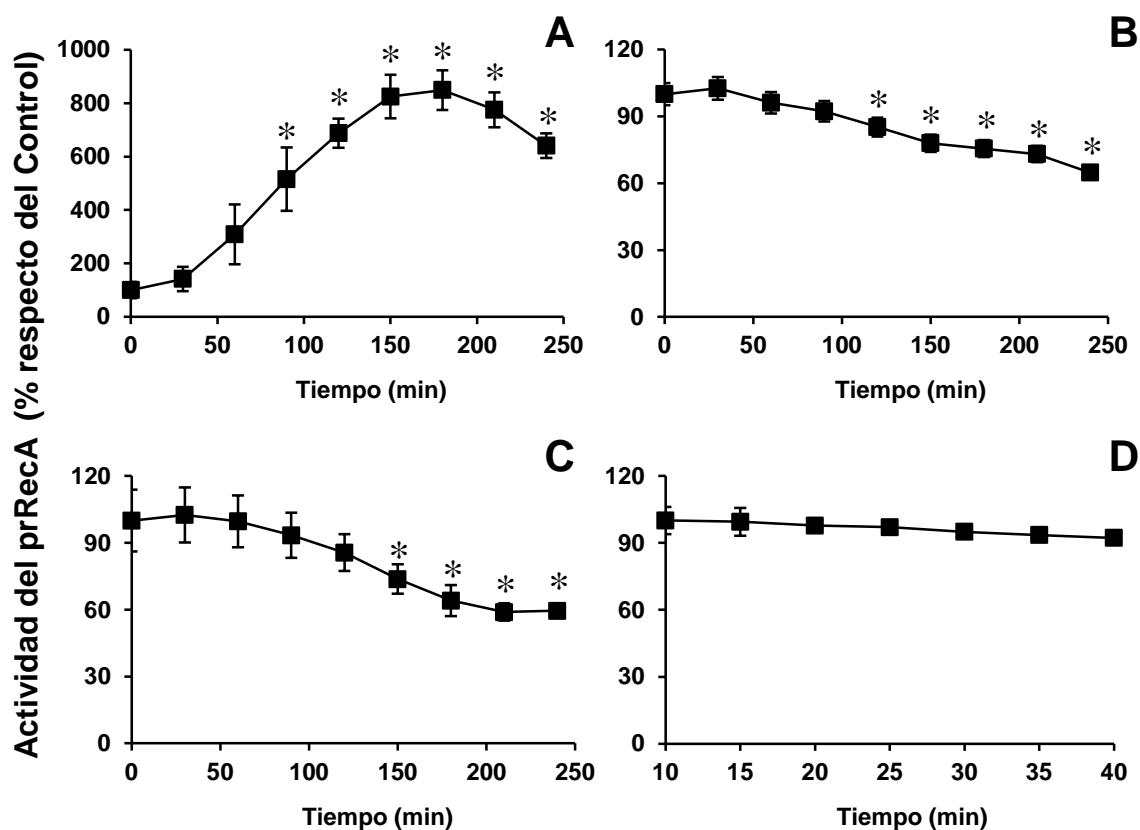


Figura 3. Progresión del nivel de emisión de luz generada por la actividad luciferasa basal del biosensor microbiano prRecA-Luc2 a lo largo del tiempo, habiendo procesado diferentes volúmenes del cultivo bacteriano en fase de crecimiento exponencial: 1 ml (A), 500 µl (B) y 50 µl (C y D). Las muestras extraídas se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl de medio DMEM, se sonicaron durante 1 min y se midió la actividad luciferasa. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto al Control, considerado como el valor de luz debida a la actividad basal del prRecA obtenido en el primer tiempo de medida, y representan la media ± SD de un triplicado de muestras de tres cultivos bacterianos. *, $p < 0,05$, comparado con el Control por el test *t* para valores apareados.

A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que el nivel de luz alcanzado fue bueno en todos los casos, se decidió trabajar con un volumen de muestra pequeño, de 50 µl, dando margen de estabilidad de la señal de luz (observada hasta con un volumen de 500 µl). Así, en el caso de que la densidad óptica del cultivo bacteriano fuese mayor por las condiciones del ensayo y se procesara un número mayor de bacterias en el volumen de 50 µl, no se perdería la estabilidad de la señal de luz emitida. Además, se introdujo en el protocolo experimental un tiempo de incubación sin recogida de datos de 10 min tras la mezcla de la solución de reactivos de la luciferasa con las bacterias sonicadas, con el fin de permitir la estabilización de la medida de bioluminiscencia.

4.1.3.2. TIEMPO DE INDUCCIÓN DEL BIOSENSOR

Como ya se describió en el apartado 4.1.1, la expresión de las proteínas codificadas por los genes SOS ocurre de manera escalada en el tiempo, siendo *recA* uno de los genes que primero se expresan, desde de la inducción de la respuesta SOS (Janion, 2008). En un trabajo llevado a cabo por Song Y. *et al.* en el que también usaban un biosensor microbiano basado en la actividad de RecA para la detección de compuestos tóxicos, establecían un período de 3 h como el tiempo óptimo inducción del biosensor (Song, 2009).

Con el fin de fijar un tiempo adecuado de incubación del biosensor microbiano prRecA-Luc2 con un compuesto cuyo efecto genotóxico se quiera determinar, se estudió la evolución temporal de la inducción del prRecA por cisplatino.

Previamente, se ajustaron las condiciones del ensayo de genotoxicidad. Se estableció iniciar la incubación del biosensor microbiano prRecA-Luc2 con el compuesto a evaluar, una vez que el cultivo bacteriano hubiese alcanzado una densidad óptica (D.O.) de 0,3 UA a λ de 600 nm, lo cual indicaba que estaba en fase de crecimiento exponencial. También se observó que un volumen de 5 ml del biosensor, partiendo del valor de D.O. indicado anteriormente, se mantenía en crecimiento exponencial al menos durante 4 h, sin que alcanzara la fase estacionaria (Figura 4A).

En las condiciones indicadas, el biosensor microbiano prRecA-Luc2 se incubó con 25 μ M de cisplatino o con el vehículo (DMSO) durante dos tiempos diferentes (2 h y 4 h), tras los cuales se extrajeron muestras del biosensor que fueron procesadas para medir la actividad luciferasa (Figura 4B). La concentración de cisplatino utilizada no resultó tóxica en las condiciones ensayadas (dato no mostrado).

Tal y como se observa en la Figura 4B, la intensidad de luz emitida por el biosensor microbiano prRecA-Luc2 tanto a 2 h como a 4 h de exposición al cisplatino se incrementó de manera estadísticamente significativa, respecto de la señal obtenida en el tiempo inicial, como consecuencia de su efecto genotóxico. Además, se mantenía proporcional a lo largo del tiempo estudiado, de manera que los valores de luz se ajustaban a una recta ($y = 108,7 x + 101,2$, $r^2 = 0,999$). No se observó el mismo comportamiento en la señal de luz en el grupo control, que solo experimentó un ligero aumento de su intensidad a las 4 h de incubación, no estadísticamente significativo, debido probablemente al aumento del número de bacterias como consecuencia del crecimiento del cultivo.

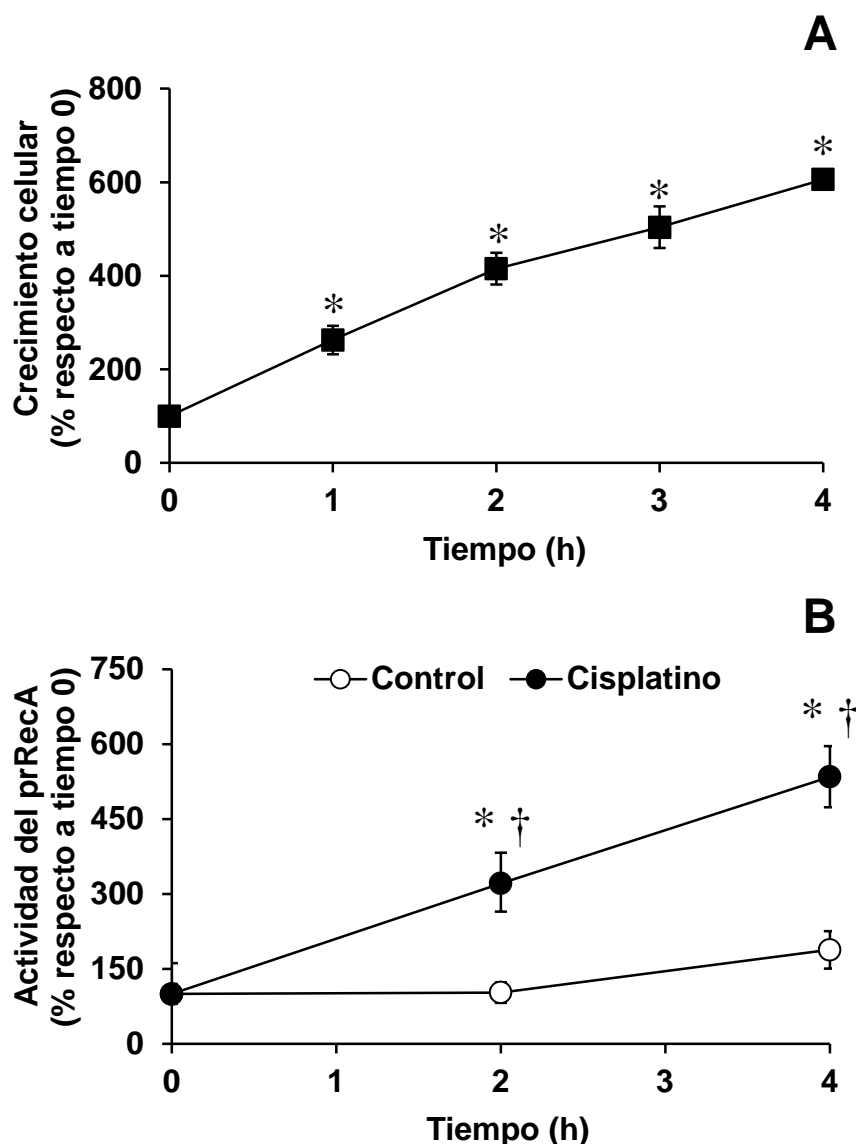


Figura 4. (A) Crecimiento del biosensor microbiano prRecA-Luc2 (5 ml) a lo largo del tiempo, en agitación a 37°C. La D.O. del cultivo bacteriano se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a la λ de 600 nm. (B) Efecto del cisplatino sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2 a diferentes tiempos de exposición. Las bacterias constituyentes del biosensor en fase de crecimiento exponencial (D.O. de 0,3 UA a λ de 600 nm) se incubaron con 25 μ M de cisplatino o sólo con el solvente DMSO (Control) durante 2 o 4 h en agitación a 37°C. Las muestras extraídas se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ l de medio DMEM, se sonicaron durante 1 min y se midió la actividad luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al valor de luz debido a la actividad del prRecA a tiempo 0 y representan la media \pm SD de un triplicado de muestras de tres cultivos bacterianos. *, $p < 0,05$, comparado con el tiempo 0 por el test t para valores apareados; †, $p < 0,05$, respecto al Control por el test t de Student.

Puesto que el incremento de la intensidad de luz emitida por el biosensor fue similar para cada uno de los tiempos de exposición al cisplatino ensayados (+212% a las 2 h y +188% a las 4 h), se eligió la incubación de 2,5 h como el tiempo de

inducción del biosensor microbiano prRecA-Luc2, por ser un tiempo de análisis próximo al tiempo de 2 h en el que se obtuvo el mayor valor de luz debida a la actividad del prRecA y al establecido en otros trabajos basados en ensayos de inducción de la respuesta SOS (Song, 2009). Además, un tiempo de análisis corto se considera una propiedad deseable de un biosensor.

4.1.3.3. LISIS CELULAR

Hasta el momento, en el protocolo experimental seguido en la puesta a punto del método de medida de la luz emitida por el biosensor microbiano prRecA-Luc2, se había incluido un paso de sonicación de las bacterias con el fin de lisarlas para facilitar la reacción enzimática de la luciferasa durante la incubación con “Steady-Glo Luciferase Assay System”. La composición de este reactivo incluye compuestos detergentes que favorecen la lisis celular, pero su uso está indicado para células eucariotas y no para bacterias, las cuales, a diferencia de las primeras, cuentan con una pared celular externa. Por esta razón, pensamos que la mezcla del biosensor microbiano prRecA-Luc2 con la solución de reactivos pudiera no ser suficiente para efectuar una lisis completa de la pared celular e incluimos la sonicación en el procesamiento previo a la reacción de la luciferasa.

Para determinar si la sonicación era un buen método de lisis celular en el pretratamiento de las muestras y favorecía la reacción, se decidió compararlo con otras condiciones que pudieran favorecer la ruptura de la pared celular bacteriana: incubación de las muestras con el detergente SDS al 10% combinada o no con la sonicación.

Para analizar el efecto de los distintos métodos de lisis bacteriana sobre la señal de luz debida a la actividad de la luciferasa, se incubó el biosensor microbiano prRecA-Luc2 con o sin cisplatino y se tomaron muestras de ambas condiciones experimentales para procesarlas aplicando los diferentes métodos de lisis celular indicados anteriormente.

Tal y como se representa en la Figura 5, el tratamiento con SDS al 10% solo o combinado con la sonicación provocaron una fuerte disminución, de magnitud similar en ambos casos, del nivel basal de luz emitida por el biosensor microbiano prRecA-Luc2, al compararlo con el control, que se corresponde con muestras no incubadas con cisplatino, diluidas en proporción 1:1 con agua ultrapura y sonicadas. En la

condición de incubación con cisplatino, se observó un aumento significativo de la señal de luz emitida por el biosensor, mientras que el tratamiento con SDS al 10% sin combinar con la sonicación la redujo de forma marcada respecto al grupo control y aún más cuando se combinó con la sonicación.

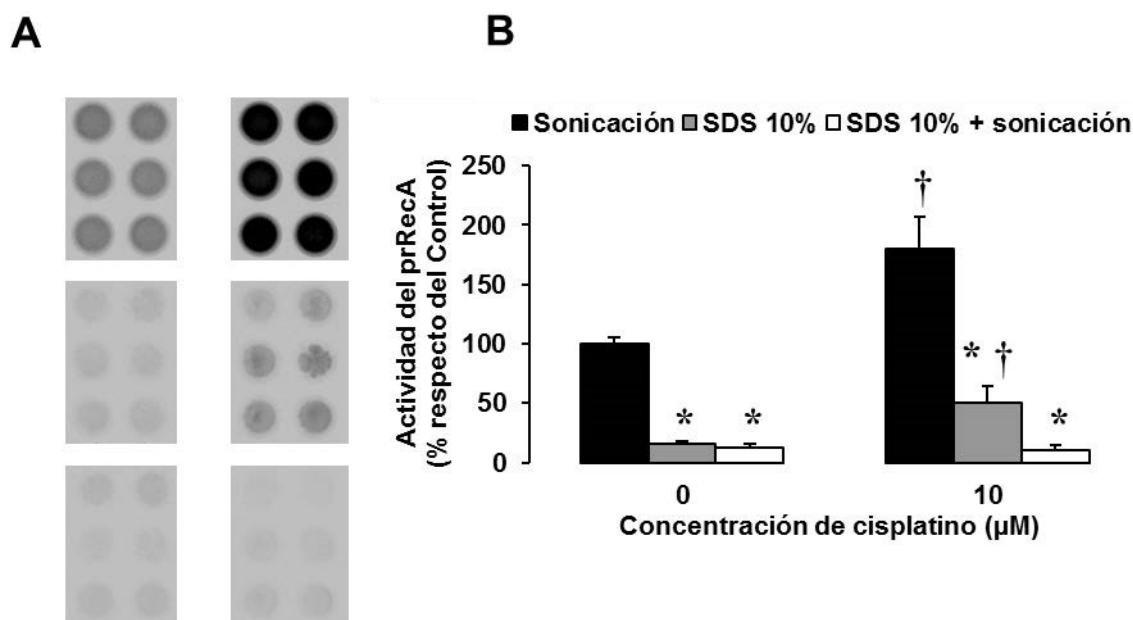


Figura 5. Imagen representativa (A) y representación gráfica (B) del efecto de diferentes tratamientos de lisis sobre la actividad luciferasa del biosensor microbiano prRecA-Luc2. Las bacterias en crecimiento exponencial se incubaron con 10 µM cisplatino o sólo con el solvente DMSO durante 2,5 h en agitación a 37°C. Después, las muestras del biosensor fueron sometidas a diferentes tratamientos de lisis: sonicación durante 1 min, incubación con 10% SDS durante 15 min a temperatura ambiente y una combinación de ambos. Finalmente, se midió la actividad luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al Control, considerado el valor de luz debida a la actividad basal del prRecA y obtenida usando la sonicación como método de lisis celular, y representan la media ± SD de un triplicado de muestras de tres cultivos. *, p<0,05, respecto a la muestra sólo sonicada, para bacterias incubadas o no con cisplatino; †, p<0,05, respecto a la actividad luciferasa basal para cada condición experimental por el test *t* de Student.

Estos resultados indicaban que la acción detergente del SDS sobre la lisis bacteriana no se reflejaba en un aumento de la señal de luz emitida por el biosensor, sino que ésta se reducía significativamente, probablemente porque el SDS afectaba a la actividad luciferasa y disminuía el rendimiento de la reacción. Este efecto se reflejaba en ambas condiciones experimentales de incubación en ausencia y presencia de cisplatino. El efecto de inducción del prRecA por la acción genotóxica del cisplatino se observó cuando se usaba la sonicación como método de lisis celular y dicho efecto se enmascaraba de manera marcada por el tratamiento con SDS al 10% y de forma total por dicho tratamiento combinado con la sonicación.

Nos planteamos si la sonicación también podría tener un efecto negativo sobre la actividad de la luciferasa. También decidimos confirmar el efecto de mejora, debido a la dilución con agua, sobre la señal de luz emitida por la luciferasa con el fin de suprimir el uso de DMEM y simplificar el método.

Se analizó el nivel de luz basal obtenido en diferentes muestras del biosensor microbiano prRecA-Luc2 en fase exponencial con o sin sonicación y dilución previa con agua en proporción 1:1. Como se muestra en la Figura 6, la sonicación no modificó la señal de luz en comparación con la obtenida a partir de las muestras no tratadas, lo que indicaba que la acción de los ultrasonidos aplicados no causaba un efecto negativo sobre la actividad de la luciferasa. La dilución de la muestra antes de su sonicación, incrementó la señal de luz con respecto a las otras condiciones (Figura 6).

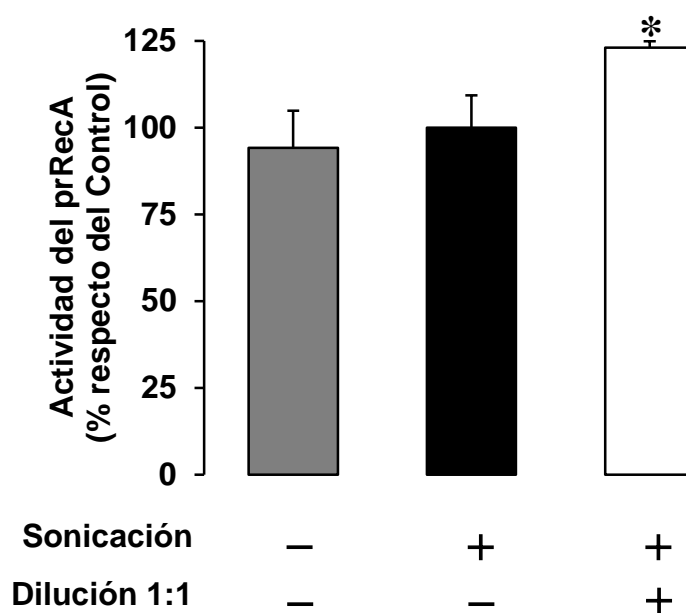


Figura 6. Efecto del tratamiento de lisis bacteriana por sonicación sobre la actividad luciferasa basal del biosensor microbiano prRecA-Luc2. Se extrajeron muestras del cultivo bacteriano en fase de crecimiento exponencial que se sometieron a diferentes condiciones: sin tratamiento, sonicación durante 1 min, sola o combinada con dilución previa en proporción 1:1 con agua. Finalmente, se midió la actividad luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al Control, considerado el valor de luz debida a la actividad basal del prRecA y obtenida usando la sonicación como método de lisis celular, y representan la media \pm SD de un triplicado de muestras de tres cultivos bacterianos. *, $p < 0,05$, respecto al Control por el test t de Student.

Del mismo modo también se consiguió buena reproducibilidad de la señal usando medio LB (datos no mostrados); por lo que se decidió establecer un procesamiento más sencillo, que consistió en que las bacterias eran sonicadas

directamente en el medio LB del cultivo original, diluidas en proporción 1:1 con agua y mezcladas finalmente con el reactivo de la luciferasa.

Para resumir el procedimiento de puesta a punto de la medida de actividad luciferasa del biosensor prRecA-Luc2, las condiciones experimentales de manejo y operación fijadas para llevar a cabo la evaluación de la genotoxicidad de diferentes agentes fueron las siguientes:

- Incubación de 5 ml del cultivo de bacterias constituyentes del biosensor microbiano prRecA-Luc2, crecido en condiciones de selección y habiendo alcanzado una D.O. de 0,3 UA (λ de 600 nm), con un volumen de solución \leq 50 μ l del agente cuyo efecto genotóxico se quiere determinar durante 2,5 horas en agitación a 37°C.
- Obtención de muestras de 100 μ l por triplicado para cada condición experimental del biosensor.
- Dilución de las muestras en proporción 1:1 con agua.
- Sonicación de las muestras durante 1 min en un baño de ultrasonidos previamente enfriado.
- Mezcla de 50 μ l de cada muestra diluida y sonicada del biosensor con 50 μ l de solución de reactivo "Steady-Glo Luciferase Assay System".
- Incubación de la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente desde el inicio de la reacción de luciferasa y, transcurrido ese tiempo de estabilización de la señal, captura de imágenes tras 1 min de exposición en un equipo de imagen durante 15 min.

4.1.4. VALIDACIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2: ELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA

Con el objetivo de validar el funcionamiento del biosensor microbiano prRecA-Luc2, decidimos analizar la actividad de la proteína RecA de dos cepas bacterianas diferentes en situaciones de genotoxicidad.

El funcionamiento del biosensor microbiano prRecA-Luc2 requiere de la presencia de una proteína RecA activa desde el punto de vista funcional que asegure, por el reconocimiento del daño en el ADN y por su acción coproteasa, la inducción de la

respuesta SOS y, como consecuencia, un aumento de la expresión de la luciferasa ante una situación de estrés genotóxico.

Quisimos comparar el efecto del cisplatino sobre dos cepas de *E. coli* diferentes: DH5 α y BL21(DE3), portando el biosensor prRecA-Luc2. La cepa bacteriana DH5 α , a diferencia de la BL21(DE3), presenta en su genotipo una variante del gen *recA* (*recA1*), que codifica para la proteína mutada RecA1 en la que la glicina de la posición 160 es reemplazada por un residuo de ácido aspártico (p.G160D) como consecuencia de una mutación puntual (Bryant, 1988).

Los cultivos de bacterias DH5 α y BL21(DE3) constituyentes del biosensor prRecA-Luc2 se crecieron en presencia de 25 μ M de cisplatino y en ausencia del mismo. La Figura 7 muestra la intensidad de luz emitida por cada uno de los biosensores.

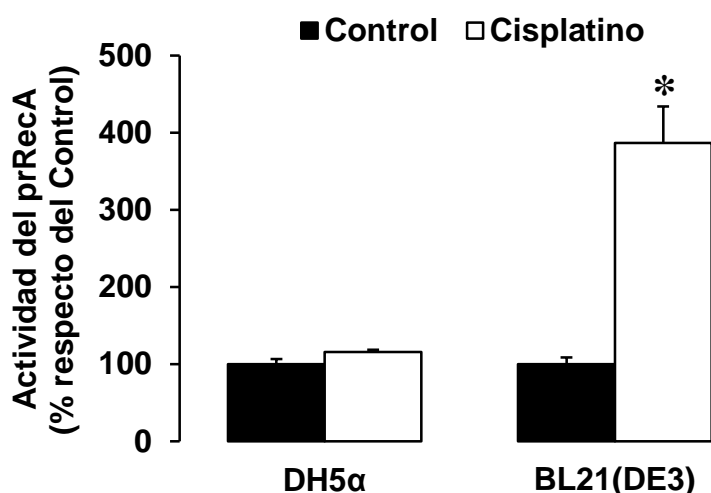


Figura 7. Efecto del cisplatino sobre los biosensores microbianos prRecA-Luc2 constituidos por bacterias *E. coli* de las cepas DH5 α y BL21(DE3). Los cultivos de bacterias en fase de crecimiento exponencial (D.O. de 0,3 UA a λ de 600 nm) se incubaron con 25 μ M cisplatino o sólo con el solvente DMSO (Control) durante 2,5 h en agitación a 37°C antes de medir la actividad luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al Control y representan la media \pm SD de un triplicado de muestras de tres cultivos bacterianos. *, $p < 0,05$, comparado con el Control por el test *t* de Student.

En el caso de la cepa BL21(DE3), la señal de luz se incrementó de manera significativa tras la exposición al cisplatino (+286%) respecto de su control, mientras que en el caso de la cepa DH5 α no se encontraron cambios en el nivel de luz emitida por el biosensor como consecuencia de la acción del cisplatino (Figura 7).

Los resultados obtenidos confirman que la cepa bacteriana que no sea defectiva en las funciones del gen *recA*, como BL21(DE3), actúa como elemento de reconocimiento del biosensor prRecA-Luc2, puesto que la señal de luz emitida por el biosensor prRecA-Luc2 aumenta en respuesta al cisplatino. Así pues, el biosensor prRecA-Luc2 no resulta válido usando la cepa DH5 α de *E. coli* pero sí la cepa BL21(DE3), cuyo genotipo no presenta mutaciones que afecten a la función de ninguno de los genes SOS. De hecho, la cepa DH5 α al carecer de la proteína RecA activa, es comúnmente utilizada en técnicas de clonación al no poseer capacidad de recombinación homóloga (Grant, 1990). En estudios previos, ya se había demostrado la influencia de la funcionalidad del gen *recA* sobre la viabilidad celular de diferentes cepas *E. coli* K12, observándose una pérdida mayor de la viabilidad celular tras la exposición a metales pesados en aquellas que no portaban un gen *recA* funcional (Shapiro, 1996).

4.1.5. VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE GENOTOXICIDAD BASADO EN EL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2

El siguiente paso fue validar el ensayo de genotoxicidad basado en el biosensor microbiano prRecA-Luc2 en las condiciones fijadas en la puesta a punto de la medida de la actividad luciferasa.

Se eligió el cisplatino como agente genotóxico inductor de la respuesta SOS para llevar a cabo esta validación. De forma previa se determinó el efecto tóxico del cisplatino sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2 con el fin de elegir una concentración subtóxica del compuesto. Tras la exposición de las bacterias a concentraciones de cisplatino de hasta 50 μ M durante 2,5 h no se observó una reducción del crecimiento del cultivo (datos no mostrados).

Como se muestra en la Figura 8, se observó una estimulación mediada por el cisplatino de la actividad del promotor del gen *recA* de manera dosis dependiente; es decir, la intensidad de la luz emitida fue mayor al aumentar la concentración de cisplatino en el medio. Además, los valores de luz se ajustaron a una recta ($y = 14,3x + 119,4$; $r^2 = 0,9526$).

Los resultados obtenidos indican que la señal de luz emitida por el transductor del biosensor microbiano prRecA-Luc2 es proporcional al daño en el ADN causado por concentraciones subtóxicas de cisplatino. Así, se espera un mayor efecto genotóxico del

cisplatino a concentraciones crecientes y una mayor inducción de la respuesta SOS como respuesta al daño en el ADN, lo cual se traduce en un aumento de la intensidad de luz emitida por el biosensor.

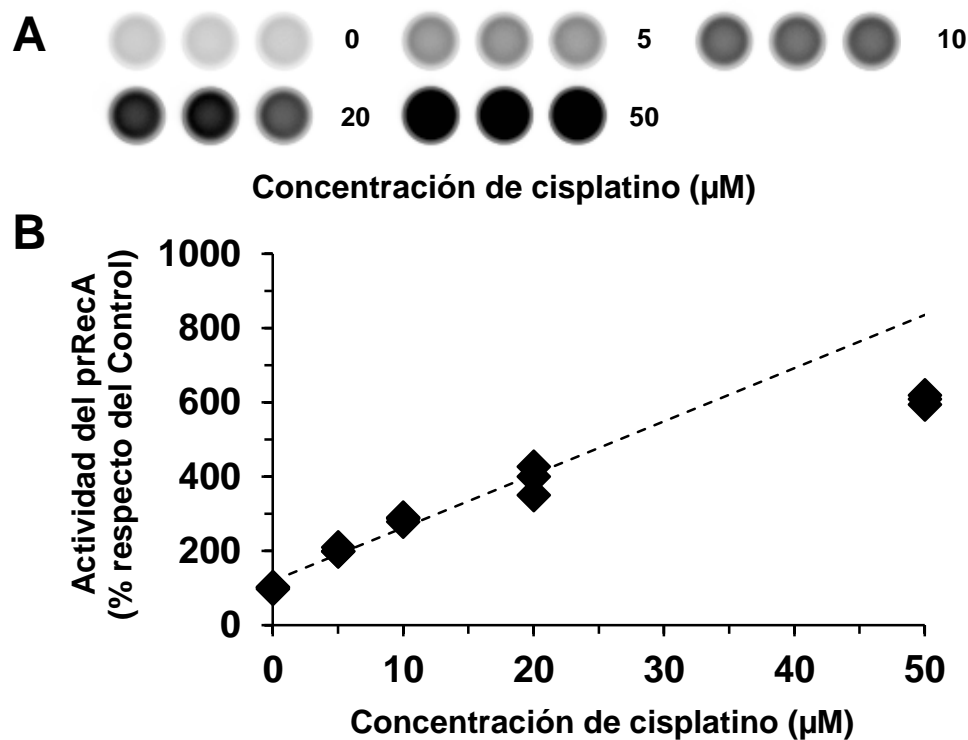


Figura 8. Imagen representativa (A) y representación gráfica (B) del efecto del cisplatino sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2. Los cultivos de bacterias constituyentes del biosensor en fase de crecimiento exponencial se incubaron con diferentes concentraciones de cisplatino o sólo con el solvente DMSO (Control) durante 2,5 h en agitación a 37°C, antes de medir la actividad luciferasa. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al Control y representan la media \pm SD de un triplicado de muestras correspondientes a tres ensayos diferentes.

Hasta el momento, se puede decir que el biosensor microbiano prRecA-Luc2 que hemos obtenido y validado es un dispositivo analítico fiable, con un bajo coste de producción, que requiere un manejo sencillo y permite llevar a cabo análisis en tiempos cortos. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar su utilidad en la detección de potenciales agentes genotóxicos:

i) A nivel medioambiental, para lo cual utilizamos varios metales pesados que frecuentemente contaminan suelos y aguas.

ii) A nivel agroalimentario, realizando estudios de detección de agentes genotóxicos en piensos y diferentes productos agrícolas.

iii) A nivel biosanitario, evaluando la capacidad genotóxica de varios compuestos químicos y biológicos con acción farmacológica considerados potenciales agentes carcinógenos.

4.1.6. APLICACIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2 EN LA DETECCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS A NIVEL MEDIOAMBIENTAL

Los metales pesados son elementos naturales que tienen un peso atómico elevado y su densidad es cinco veces mayor que la del agua. Se caracterizan por presentar un grado alto de toxicidad. Sus diversas aplicaciones industriales, domésticas, agrícolas, médicas y tecnológicas han provocado su amplia distribución y acumulación en el medio ambiente, aumentando la preocupación sobre sus efectos nocivos potenciales en el mismo y sobre la salud humana. Su toxicidad depende de varios factores entre los que se incluye la concentración, el tiempo y la forma de exposición, entre otros.

Para la aplicación del biosensor microbiano prRecA-Luc2 en el ámbito medioambiental decidimos evaluar la genotoxicidad del plomo, el cadmio y el cromo, que están incluidos en el grupo de los metales pesados. En general, son considerados como agentes tóxicos sistémicos que inducen daño en los órganos y carcinógenos humanos según la “Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer” (Tchounwou, 2012). El plomo exhibe un alto grado de toxicidad especialmente en niños. Puede afectar a diversos órganos del cuerpo por exposición aguda o crónica: cerebro, riñones, sistema nervioso central y sistema reproductor. El cadmio se acumula principalmente en los riñones y en el hígado pudiendo generar necrosis hepática (Dudley, 1982). El cromo, por su parte, ha sido identificado como un micronutriente esencial, pero la exposición al mismo por inhalación aumenta el riesgo de cáncer en el sistema respiratorio (Gibb, 2000) y se ha demostrado su actividad cocarcinogénica (Uddin, 2007).

4.1.6.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO Y ANTIPROLIFERATIVO DE LOS METALES PESADOS SOBRE CÉLULAS ENTEROHEPÁTICAS

El estudio de la toxicidad de los metales pesados se inició evaluando el efecto del $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Pb^{2+}), CdCl_2 (Cd^{2+}) y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Cr^{6+}) sobre la viabilidad celular de

diferentes líneas celulares hepáticas (HepG2 y Alexander) e intestinales (LS174T y Caco-2) de origen humano tras distintos tiempos de exposición.

Utilizando el test de formazán, se determinó la toxicidad aguda causada por estos metales pesados sobre los distintos tipos de células tras una exposición de 6 h (Figura 9). El nitrato de plomo resultó tóxico a concentraciones elevadas, superiores a 1 mM, sobre las diferentes líneas celulares, salvo en el caso de las células Alexander, que experimentaron una caída significativa de su viabilidad a partir de 200 μM (Figura 9A); el valor de la concentración del compuesto requerida para reducir la viabilidad celular al 50% (IC_{50}) en las células Alexander se aproximaba a 2 mM, mientras que para las demás líneas celulares la IC_{50} superaba ese valor. El cloruro de cadmio, por su parte, fue más tóxico en todas las líneas celulares en comparación con el nitrato de plomo tras 6 h de exposición, oscilando el valor de la IC_{50} entre 150 μM , para las células LS174T, y 400 μM , para las células HepG2 (Figura 9C). Las mayores diferencias de sensibilidad entre las distintas líneas celulares se obtuvieron con el dicromato potásico, siendo las células de origen hepático más sensibles a este compuesto que las intestinales, y en especial las células Alexander (Figura 9E). En cuanto a los valores de la IC_{50} obtenidos para el dicromato potásico, resultaron muy variables, adquiriendo un valor en torno a 6 μM en el caso de las células Alexander, superior a 500 μM para las LS174T y valores intermedios en las células HepG2 y Caco-2, de 40 y 100 μM , respectivamente.

Siguiendo el mismo procedimiento, también se determinó el efecto antiproliferativo de estos contaminantes ambientales tras una exposición de 72 h. El efecto citostático mayor se obtuvo con el dicromato potásico, obteniéndose un comportamiento prácticamente idéntico de las cuatro líneas celulares (Figura 9F), a diferencia de lo que ocurría tras la exposición a 6 h (Figura 9E); el valor de la IC_{50} fue de aproximadamente 2 μM en todos los casos y se observó una pérdida total de la viabilidad celular en la condición correspondiente a la concentración de 20 μM (Figura 9F). Aunque el cloruro de cadmio provocó una muerte celular total a la concentración de 100 μM después de 72 h de exposición (Figura 9D), existían diferencias en el efecto del mismo sobre los distintos tipos celulares, que se reflejaban en los valores de la IC_{50} : 2 μM en Alexander, 6 μM en HepG2 y Caco-2 y 28 μM en LS174T. Por último, el nitrato de plomo tuvo un efecto antiproliferativo menor, solo significativo a concentraciones altas (Figura 9B), salvo en el caso de las células Alexander, que resultaron más sensibles a la acción de este compuesto con un valor de la IC_{50} de 0,3 mM.

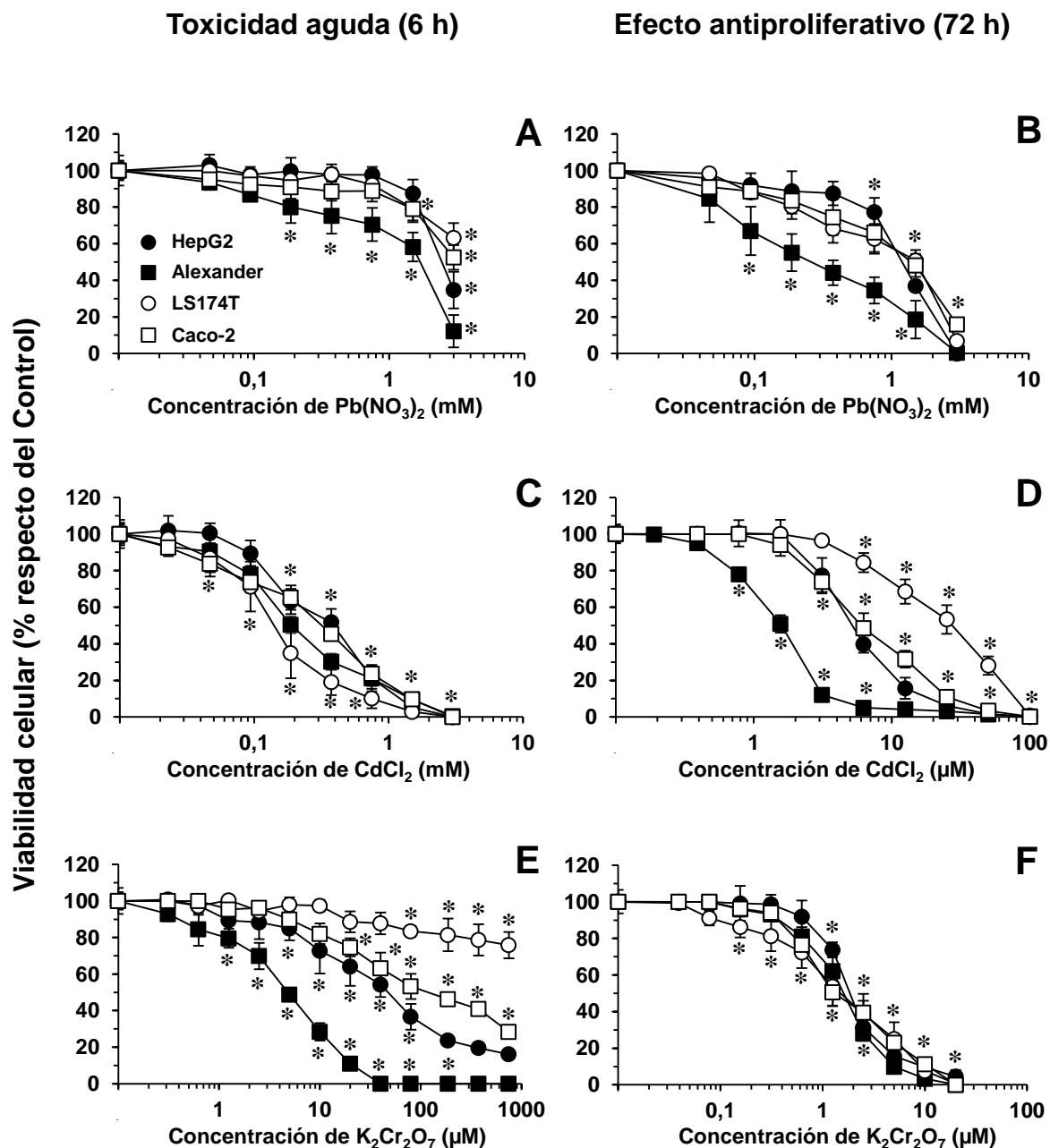


Figura 9. Toxicidad aguda y efecto antiproliferativo del $Pb(NO_3)_2$ (A y B, respectivamente), $CdCl_2$, (C y D, respectivamente) y $K_2Cr_2O_7$ (E y F, respectivamente) sobre diferentes líneas celulares: HepG2 (círculos negros), Alexander (cuadrados negros), LS174T (círculos blancos) y Caco-2 (cuadrados blancos). La viabilidad celular se determinó mediante el test de formazán tras exponer las células a diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos durante 6 y 72 h para determinar la toxicidad aguda (A, C y E) y el efecto antiproliferativo (B, D y F), respectivamente. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al Control, considerado como el valor de viabilidad de las células no tratadas (100%), y representan la media \pm EEM de un triplicado de muestras de al menos tres ensayos diferentes. *, $p < 0,05$ comparado con el Control por el test t para valores apareados.

Los resultados obtenidos confirmaron la alta toxicidad de estos compuestos en células humanas, sobretodo el CdCl_2 y el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, pero a pesar de las diferencias observadas, estos ensayos no permitían esclarecer si la pérdida de viabilidad celular era debida a un efecto genotóxico. Sin embargo, sí pudimos establecer las concentraciones tóxicas y subtóxicas de estos compuestos, así como valores de IC_{50} , para compararlas con ensayos posteriores.

4.1.6.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE LOS METALES PESADOS SOBRE CÉLULAS BACTERIANAS

El siguiente paso fue evaluar el efecto de los metales pesados sobre el crecimiento de un cultivo de bacterias *E. coli* BL21(DE3), de la misma cepa que las utilizadas en el desarrollo del biosensor prRecA-Luc2, y así, poder seleccionar las concentraciones no tóxicas de los compuestos tras 2,5 h de incubación, que se usarían posteriormente el ensayo de genotoxicidad basado en el uso del biosensor microbiano prRecA-Luc2.

Para ello, las bacterias se incubaron en presencia de distintas concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdCl_2 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y se determinó el crecimiento celular en cada caso, midiendo la D.O. (λ de 600 nm) del cultivo a distintos tiempos, llegando hasta 4 h para garantizar un margen de seguridad o fiabilidad de los resultados obtenidos, en el caso de que se produjeran variaciones de toxicidad en los diferentes experimentos.

El nitrato de plomo hasta la máxima concentración probada de 3 mM no redujo el crecimiento de las bacterias en cultivo durante las 4 h de incubación; más bien se percibió un ligero incremento de la turbidez del medio en el caso de las concentraciones mayores que se ensayaron (Figura 10A). El cloruro de cadmio redujo marcadamente el crecimiento del cultivo bacteriano a partir de la concentración de 1,5 mM, un hecho observable desde la primera hora de incubación (Figura 10B). Finalmente, el dicromato potásico causó un descenso del crecimiento bacteriano gradual dependiente de la dosis, observándose una pérdida de la viabilidad celular con concentraciones mayores de 0,5 mM, que fue estadísticamente significativa. Sin embargo, tras 2 h de incubación solo la concentración de 1 mM, y en menor medida la de 0,75 mM, fueron tóxicas para las bacterias (Figura 10C).

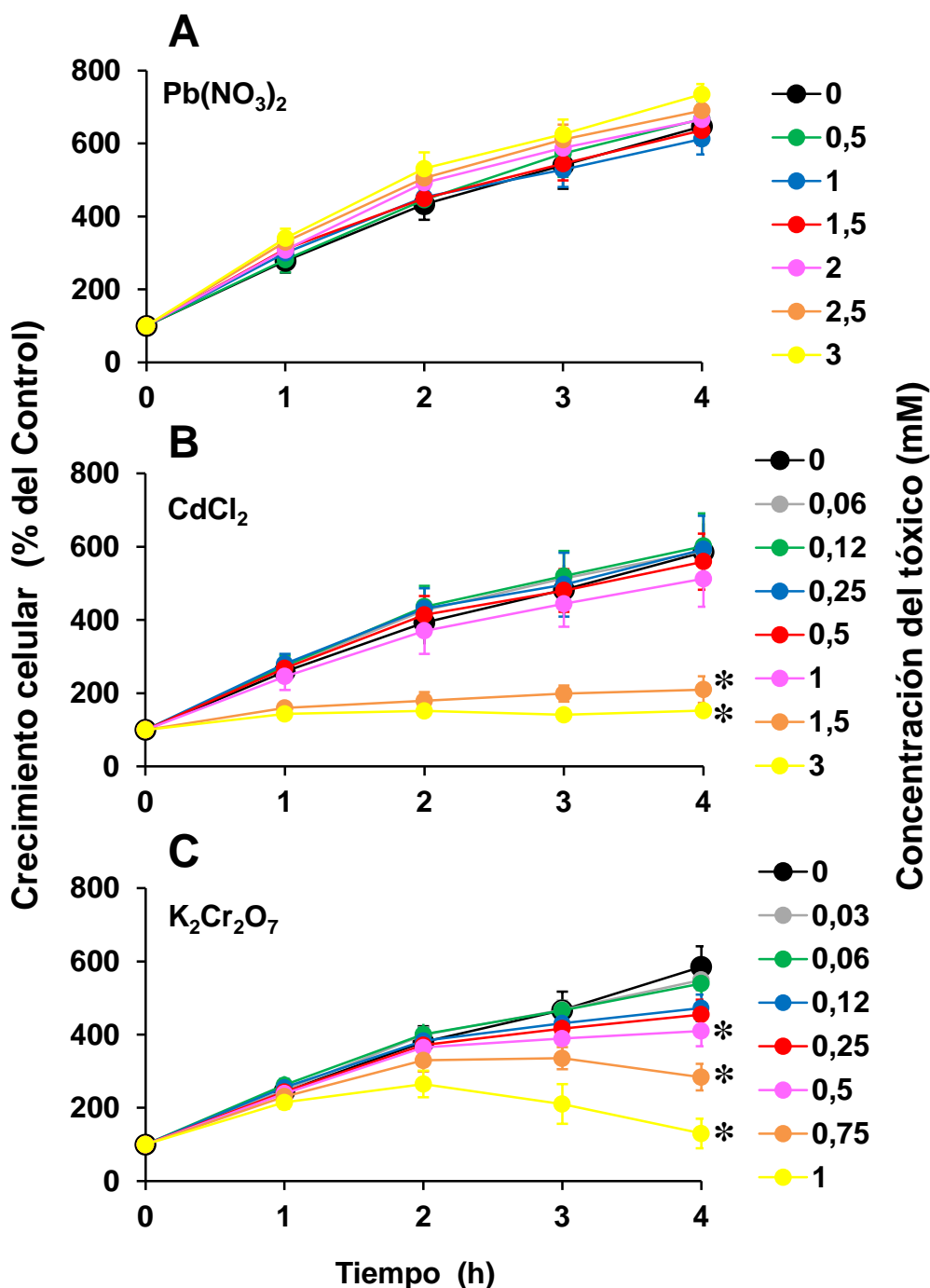


Figura 10. Efecto del $Pb(NO_3)_2$ (A), $CdCl_2$ (B), y $K_2Cr_2O_7$ (C) sobre el crecimiento de bacterias BL21(DE3). Las bacterias se crecían en medio LB y cuando alcanzaban una D.O. de 0,3 UA a λ de 600 nm se incubaron con diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ (hasta 3 mM), $CdCl_2$ (hasta 3 mM) o $K_2Cr_2O_7$ (hasta 1 mM) durante 4 h y se determinó espectrofotométricamente la absorbancia celular (λ de 600nm) para cada condición experimental. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al Control, considerado como el valor de absorbancia de cada condición experimental a tiempo 0, y representan la media \pm EEM de un duplicado de muestras de al menos tres ensayos diferentes. *, $p < 0,05$, comparado con el valor de absorbancia de las bacterias crecidas en ausencia de metales pesados por el test t para valores apareados.

La pequeña estimulación del crecimiento bacteriano en el caso de las bacterias incubadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ pudiera deberse a que este compuesto es capaz de estimular la proliferación celular, como se sugiere en un trabajo en el que se observó un potencial efecto mitogénico de este mismo compuesto sobre células humanas HepG2 a niveles bajos de exposición (Tchounwou, 2004). Sin embargo, en los experimentos que llevamos nosotros a cabo en este trabajo para la evaluación de la toxicidad de los metales pesados sobre células humanas, no observamos dicho efecto (Figuras 9A y 9B).

Se deduce que, en general, las bacterias soportan la exposición a niveles más altos de metales pesados que las células humanas y que a la hora de evaluar su efecto genotóxico, éste podría ponerse de manifiesto a concentraciones tóxicas para las células animales, pero no para las bacterias. Por otra parte, destaca la mayor toxicidad del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sobre las bacterias en comparación con el CdCl_2 y el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Así, a partir de los resultados obtenidos se estableció un límite de concentración máxima de cada compuesto para usar en el ensayo de genotoxicidad: 0,5 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 1,0 mM CdCl_2 y 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Dichas concentraciones resultaron tóxicas sobre las células humanas (Figura 9); 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ causó un efecto antiproliferativo y, en el caso del CdCl_2 y el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ las concentraciones establecidas fueron 10 veces superiores a la concentración ensayada que causó una pérdida de la viabilidad celular total tras 72 h de exposición (Figura 9). Los valores establecidos pueden estar por encima de los niveles de contaminación de estos metales pesados que es posible encontrar en el medio ambiente y, por tanto, suponen un margen amplio de medida si tenemos en cuenta el tipo de muestras que habría que manejar.

4.1.6.3. ENSAYO DE GENOTOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS USANDO EL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2

Este ensayo se realizó de acuerdo a las condiciones fijadas en la puesta a punto de la medida de la actividad luciferasa del biosensor microbiano prRecA-Luc2 y en las que se llevó a cabo su posterior validación (apartados 4.1.3, 4.1.4 y 4.1.5).

En primer lugar, dado que uno de los mecanismos de acción responsables de la toxicidad de los metales pesados es la inhibición de enzimas que tienen en su centro activo grupos sulfhidrilo, nos preguntamos si estos compuestos podrían tener un efecto inhibitorio sobre la enzima luciferasa y decidimos investigar si la presencia

de estos compuestos en la mezcla de reacción podría interferir con la medida de luminiscencia.

Como se observa en la Figura 11, la adición de diferentes concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ o de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a una mezcla del lisado del biosensor prRecA-Luc2, que contenía la enzima luciferasa, con la solución de reactivos de la enzima, no afectó a la intensidad de luz producida en la reacción en todas las condiciones experimentales ensayadas.

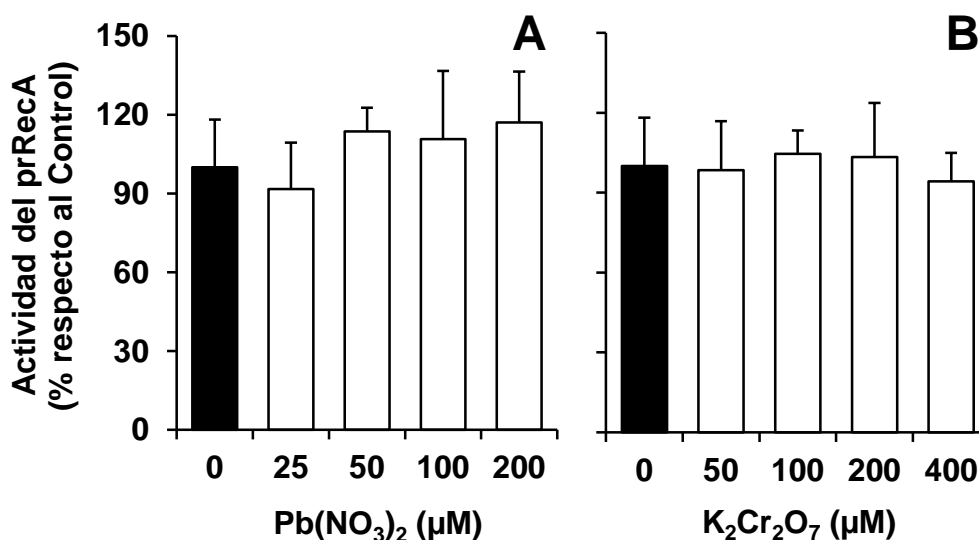


Figura 11. Efecto del $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (A) y del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (B) sobre la reacción catalizada por la luciferasa. El biosensor microbiano prRecA-Luc2 en crecimiento exponencial se cultivó durante 2,5 h en agitación a 37°C. A continuación, sobre la mezcla del lisado de bacterias que contenía la luciferasa y la luciferina, se añadieron diferentes concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ o de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y se midió la luz emitida en la reacción para cada condición experimental. Los resultados se expresan en porcentaje respecto al Control, considerado como el valor de luz emitido por el biosensor en ausencia de los compuestos, y representan la media \pm EEM de un duplicado de muestras de al menos tres ensayos diferentes. $p < 0,05$, comparado con el Control por el test t para valores apareados.

A continuación, se llevaron a cabo estudios dosis-respuesta con el objetivo de establecer una relación entre las concentraciones de los metales pesados $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CdCl_2 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y la actividad del prRecA.

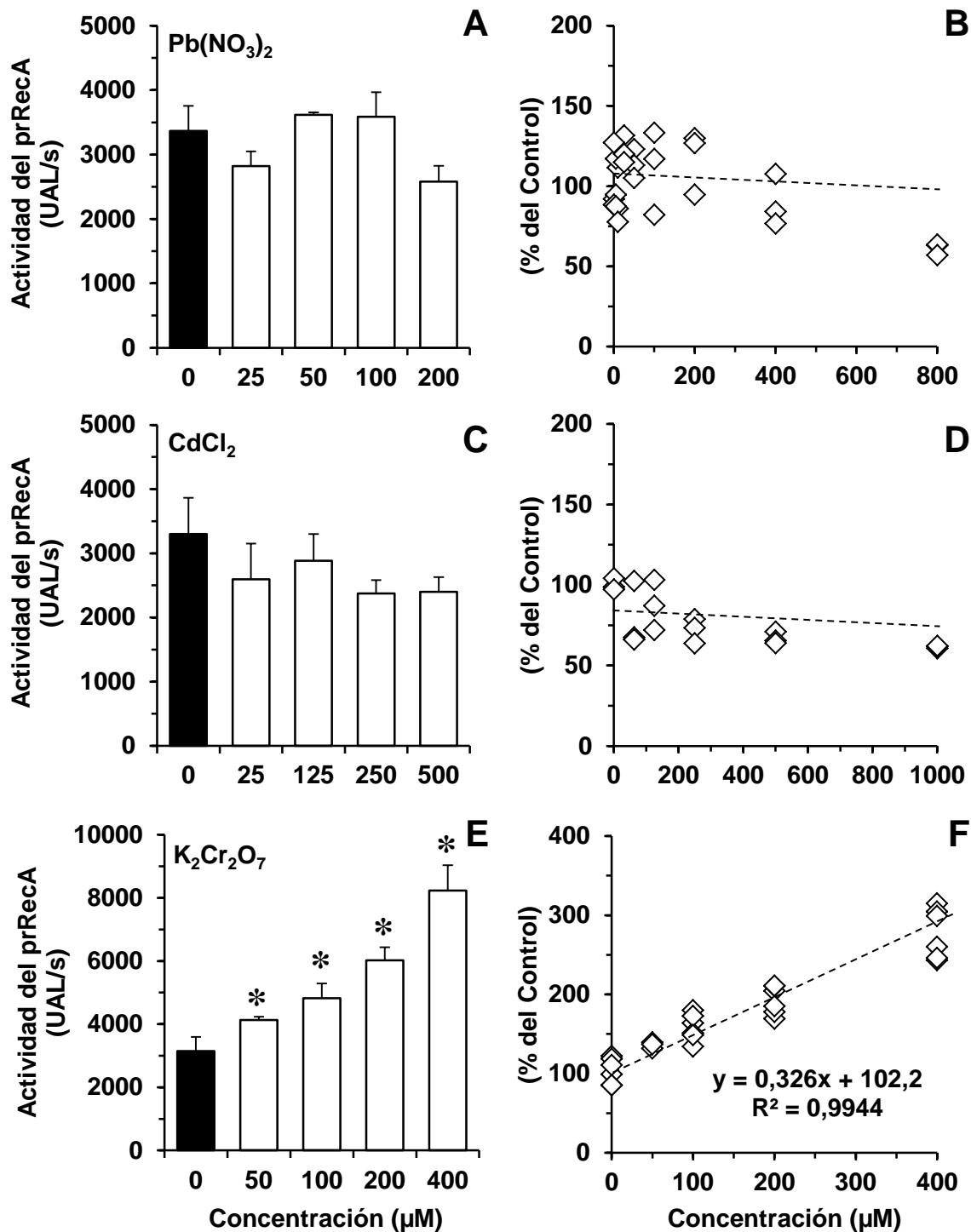


Figura 12. Efecto del $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (A y B), del CdCl_2 (C y D) y del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (E y F) sobre la actividad del biosensor prRecA-Luc2. Los cultivos de bacterias constituyentes del biosensor en fase de crecimiento exponencial se incubaron con diferentes concentraciones de los metales pesados durante 2,5 h en agitación a 37°C, antes de medir la actividad luciferasa. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de luz (UAL) por unidad de tiempo (A, C y E) o en porcentaje respecto al Control, en ausencia de los compuestos (B, D y F), y representan la media \pm SD de un triplicado de muestras correspondientes a tres ensayos diferentes. *, $p < 0,05$, comparado con el Control por el test t para valores apareados.

En la Figura 12 se muestra la respuesta del biosensor microbiano prRecA-Luc2 a la presencia de los diferentes metales pesados en el medio de cultivo. El nitrato de plomo y el cloruro de cadmio no generaron inducción del prRecA, puesto que no se observó un aumento de luminiscencia del biosensor (Figuras 12A-D). Los valores obtenidos para las diferentes concentraciones ensayadas oscilaron en torno al nivel de emisión basal, sin generar cambios significativos respecto al control. Incluso, se apreció en la luz emitida una ligera tendencia a disminuir a medida que aumentaba la concentración de los compuestos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Sin embargo, en el caso del dicromato potásico se obtuvo un resultado completamente diferente. Se observó un incremento marcado de la señal de luz emitida por el biosensor microbiano prRecA-Luc2 debido a la activación del prRecA, que fue proporcional a la concentración ensayada. Además, los valores de luz se ajustaron a una recta ($y = 0,326x + 102,2$; $r^2 = 0,9944$) (Figuras 12E-F). Este resultado fue similar al que se obtuvo anteriormente para el cisplatino (Figura 8).

Los resultados obtenidos sugieren que tanto el Cr^{6+} como el cisplatino inducen la respuesta SOS bacteriana, al contrario que el Pb^{2+} y el Cd^{2+} , al menos en nuestras condiciones experimentales. Como se explicó en el apartado 2.2.2.4. de la Introducción, la proteína RecA que funciona como el inductor de dicha respuesta, se activa ante la presencia de ADN de cadena sencilla que puede aparecer como consecuencia de un daño en el mismo o de un colapso en la horquilla de replicación, debido del mismo modo a algún tipo de lesión en el material genético.

Los tres metales pesados ensayados son considerados además de tóxicos, genotóxicos e incluso mutagénicos y carcinogénicos. El hecho de que el resultado de luminiscencia obtenido en nuestro ensayo de genotoxicidad no sea el mismo para los tres compuestos considerados genotóxicos, lleva a pensar que el mecanismo de acción de cada uno de ellos a nivel celular sea diferente, pero el propio ensayo no nos proporciona información en cuanto a los mecanismos y modos de acción de estos compuestos sobre las células.

El mecanismo de acción del plomo y el cadmio a nivel celular no se conoce con exactitud hasta el momento. Son bastantes los trabajos de investigación que demuestran que ambos metales pesados no causan un daño directo sobre el ADN (Misra, 1998) (García-Leston, 2010); sin embargo, en diferentes ensayos de genotoxicidad se han observado aberraciones cromosómicas y micronúcleos

derivados de la exposición al plomo (Johnson, 1998), así como intercambios de cromátidas hermanas consecuencia de la toxicidad citogenética causada tanto por el plomo como por el cadmio (Lin, 1994). Se ha demostrado que estos dos metales pesados estimulan la generación de radicales libres dando lugar a estrés oxidativo que provoca peroxidación lipídica, así como, de manera indirecta, daño en el ADN (Valverde, 2001). En otro estudio se observó una actividad comutagénica del plomo en combinación con la luz UV, que podría explicarse a través de la interferencia de este metal con proteínas implicadas en distintos mecanismos de reparación del ADN (Hartwig, 1990).

Por su parte, el Cr^{6+} tiene que ser reducido para ejercer una actividad genotóxica. Su metabolismo celular implica tanto la formación de intermediarios inestables como el Cr^{5+} y el Cr^{4+} , que catalizan reacciones que producen estrés oxidativo que deriva en un efecto genotóxico, como la producción de la forma estable del cromo reducido, Cr^{3+} , que causa un daño directo en el ADN por la formación de aductos, siendo ésta la manera más habitual de generar lesiones en el material genético tras la exposición a Cr^{6+} . En una revisión en la que se analizan los mecanismos de genotoxicidad de diferentes compuestos metálicos, se afirma que el cromo en su forma trivalente es el único que ejerce una acción directa sobre el ADN, mientras que para el resto de metales entre los que se incluyen el plomo y el cadmio proponen una serie de mecanismos indirectos de genotoxicidad, como generación de estrés oxidativo o interferencia con los sistemas de reparación (Beyersmann, 2008).

El mecanismo de genotoxicidad del cisplatino está bien descrito, puesto que es considerado un agente capaz de generar aductos con el ADN, que son reparados principalmente por el mecanismo NER. De hecho, el ensayo del biosensor microbiano prRecA-Luc2 indica que el cisplatino activa la respuesta SOS, al igual que el Cr^{6+} . Por tanto, podemos concluir que el biosensor microbiano prRecA-Luc2 permite discriminar y detectar de manera específica aquellos agentes genotóxicos que ejercen un daño directo sobre el ADN y no genera una respuesta de inducción de luminiscencia en los casos en los que la genotoxicidad es provocada a “largo plazo” o de una manera indirecta.

Esta conclusión está de acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio reciente, llevado a cabo en una línea celular de rata de origen hepático, en el que se analizó el patrón de expresión génica tras la exposición a diferentes metales pesados, entre los que se incluían el cromo y el cadmio. En él quedó claramente demostrado que ambos metales pesados inducen mecanismos celulares comunes, como el estrés

oxidativo; pero, tan sólo el cromo induce una expresión de genes implicados en mecanismos de reparación del ADN como NER, probablemente por la generación de aductos y de roturas de las cadenas del ADN (Permenter, 2011).

4.1.7. APLICACIÓN DEL BIOSENSOR MICROBIANO prRecA-Luc2 EN LA DETECCIÓN DE AGENTES GENOTÓXICOS A NIVEL AGROALIMENTARIO

Los procesos industriales emplean cada vez más metales y sustancias químicas potencialmente tóxicas, generando gran cantidad de residuos contaminantes orgánicos e inorgánicos. La situación se agrava porque las sales de algunos de estos metales pesados son solubles en agua y, en consecuencia, no pueden ser separadas por los métodos de purificación habituales.

Entre los metales pesados que hemos analizado en este trabajo, uno de los que presentó mayor genotoxicidad fue el Cr^{6+} . El cromo se encuentra presente en el agua y en el suelo principalmente en dos estados de oxidación: Cr^{6+} y Cr^{3+} , en forma de sales como el dicromato y el sulfato de cromo, así como óxidos de cromo y ácido crómico (Urbano, 2012). En contacto con la materia orgánica, el Cr^{6+} es reducido a Cr^{3+} , menos hidrosoluble; sin embargo, las altas concentraciones de este ion en estado hexavalente superan esta capacidad de reducción, lo que impide su adecuada eliminación (National Toxicology, 2008). Los derivados del Cr^{6+} , principalmente dicromatos, son de origen antropogénico y tienen una elevada toxicidad, como hemos puesto de manifiesto en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, su peligrosidad no es un obstáculo para su uso frecuente en la industria, desde la fabricación de pinturas, en metalurgia, el curtido del cuero o, incluso, la alimentación humana para decolorar aceites o para amarillear la leche desnatada.

En la fabricación de piensos compuestos se utilizan mezclas de harinas de origen vegetal o animal con adición de sustancias inorgánicas, a menudo cenizas ricas en minerales procedentes de la combustión de maderas y restos vegetales o en subproductos agrícolas como el orujillo, formado por los desechos de la parte sólida de la aceituna. Estos materiales pueden contener metales pesados, entre ellos el cromo hexavalente, puesto que es un contaminante habitual del agua y el suelo, que de esta forma se incorporan a la cadena trófica y pueden llegar a los humanos.

Según la legislación actual sobre calidad ambiental se establece una concentración de cromo total de 50 $\mu\text{g/l}$ (2 μM) y de 5 $\mu\text{g/l}$ (208 nM) de cromo

hexavalente como valores máximos aceptables en aguas (RD 60/2011). Sin embargo, la legislación que fija valores máximos para metales pesados en alimentación animal (RD 747/2001) considera el cromo como metal poco tóxico, fijando un límite alto para dicho compuesto.

Gracias a una colaboración establecida con la Dra. Eduarda Molina, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada, recibimos diferentes muestras de cenizas de maderas y orujillo, cuya composición se muestra en la Tabla 1, y liofilizados de verduras, que se pueden utilizar en la elaboración de piensos y materiales alimenticios para animales. Del análisis de cenizas destacó la madera “Tradema” por su elevado contenido en metales pesados como hierro, zinc y plomo (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de cenizas de diferentes muestras de orujillo y maderas, cuyo contenido en minerales se expresó en g/kg de ceniza.

| Muestra | C | N | P | K | Ca | Mg | Na | Fe | Mn | Cu | Zn | Cd | Ni | Pb | B |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|------|------|
| Orujillo (Co) | 12,6 | 0,56 | 17,4 | 50,5 | 109 | 12,2 | 15,8 | 5,42 | 0,12 | 0,13 | 0,60 | ND | 0,05 | 0,01 | 0,28 |
| Orujillo (J) | 24,2 | 1,13 | 4,17 | 57,8 | 52,2 | 15,1 | 2,83 | 6,28 | 0,17 | 0,18 | 0,27 | ND | 0,03 | 0,06 | 0,56 |
| Madera “Tradema” | 18,4 | 0,19 | 1,02 | 6,40 | 63,7 | 9,73 | 2,42 | 16,6 | 0,38 | 0,24 | 2,06 | ND | 0,05 | 0,43 | 0,20 |
| Madera “Ence” | 82,1 | 0,36 | 1,69 | 27,7 | 147 | 20,6 | 5,48 | 6,29 | 4,63 | 0,04 | 0,11 | ND | 0,05 | 0,01 | 0,22 |

ND, no detectado. (Co), procedencia Córdoba. (J), procedencia Jaén.

Decidimos llevar a cabo el ensayo de genotoxicidad basado en el uso del biosensor microbiano prRecA-Luc2 de acuerdo a las condiciones fijadas en su puesta a punto, para detectar la presencia de genotóxicos, como el dicromato, en estos materiales.

En el análisis de cenizas mostrado en la Tabla 1 no se había incluido la determinación del cromo hexavalente, por lo que decidimos, en primer lugar, medir el contenido de este metal pesado por espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito. Los resultados se muestran en la Figura 13A. De nuevo, las cenizas procedentes de madera “Tradema”, cuya composición era rica en algunos metales pesados, contenían una elevada cantidad de Cr^{6+} , probablemente en forma de dicromatos procedentes de pigmentos de pinturas que son utilizados habitualmente. En las cenizas de orujillo (J) y de madera “Ence” también se detectó Cr^{6+} , aunque en menor

cantidad, mientras que el contenido de cromo hexavalente fue inapreciable en el resto de muestras (Figura 13A).

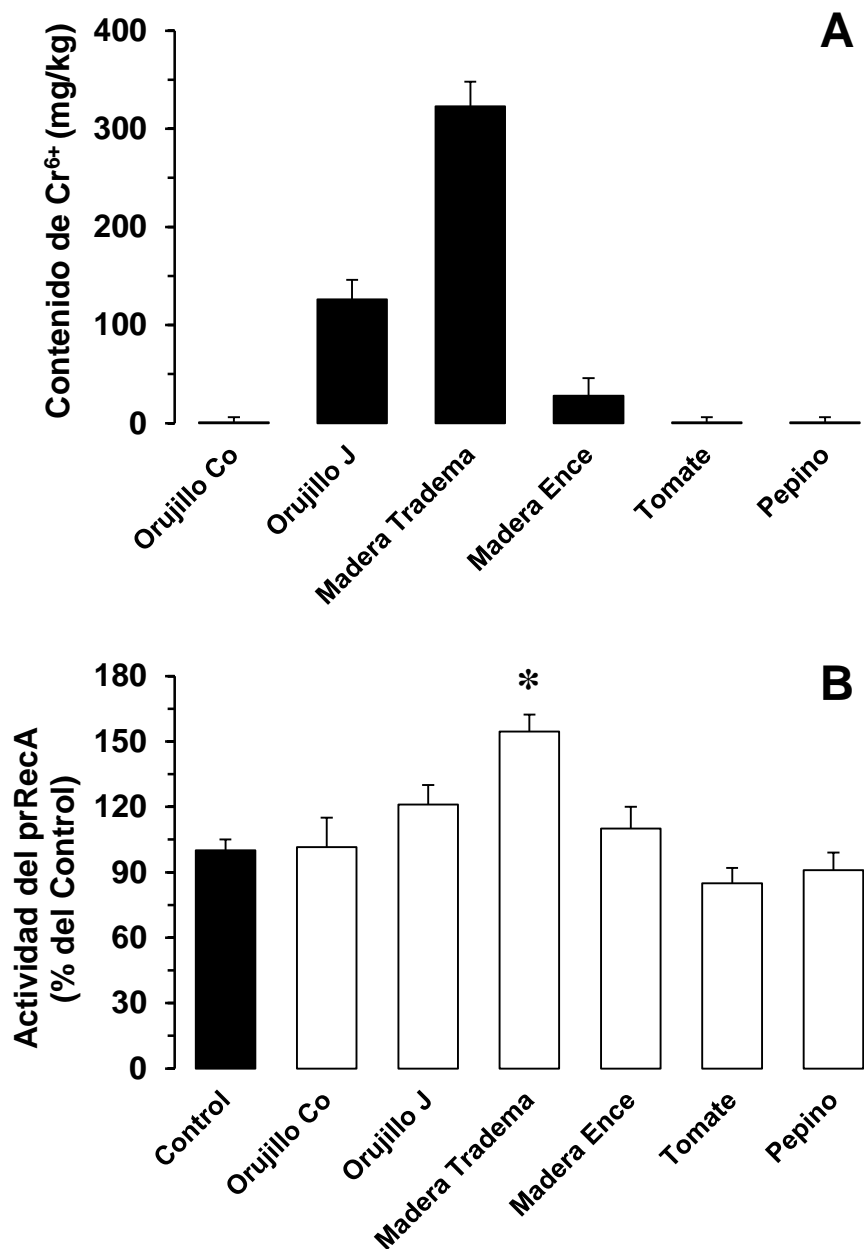


Figura 13. (A) Contenido de Cr⁶⁺ determinado por espectroscopía de absorción atómica en las diferentes muestras. Los valores representan la media \pm SD de un triplicado de muestras. (B) Efecto de los extractos acuosos de cenizas y liofilizados de verduras con distinto grado de contaminación con Cr⁶⁺ sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2. Las bacterias constituyentes del biosensor en fase de crecimiento exponencial se incubaron con 20 μ l de un extracto acuoso de 0,5 g/ml de los residuos o sólo con agua (Control) durante 2,5 h en agitación a 37°C, antes de medir la actividad luciferasa. Los resultados se expresan como porcentaje de la luz emitida respecto al Control y representan la media \pm SD de un triplicado de muestras correspondientes a tres ensayos diferentes. *, $p < 0,05$, comparado con el Control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Como el dicromato es un compuesto muy soluble en agua, era de esperar que al preparar suspensiones de las cenizas y los liofilizados en agua, esta sal se disolviera y estuviera presente en el extracto acuoso. Se ensayaron diferentes volúmenes de los extractos acuosos obtenidos para añadir al biosensor microbiano prRecA-Luc2, de los que elegimos 20 μ l para 5 ml de medio de cultivo de bacterias, puesto que volúmenes mayores resultaron tóxicos, probablemente por el pH extremadamente alcalino de las cenizas (datos no mostrados).

Se encontró un incremento de la señal de luz emitida por biosensor, debido a la activación del prRecA, tras su incubación con el extracto acuoso de madera “Tradema” rica en Cr^{6+} , que fue estadísticamente significativo (Figura 13B). Además, se observó una ligera tendencia de aumento de la señal de luz del biosensor en el caso de orujillo J y madera “Ence”, residuos que también contenían cantidades moderadas de Cr^{6+} , aunque menores que la madera “Tradema”. Los valores de emisión de luz obtenidos para los demás compuestos ensayados, en los que no se detectó Cr^{6+} , fueron similares al nivel de emisión basal del biosensor (Figura 13B).

Si el Cr^{6+} encontrado en las cenizas de madera “Tradema” se encontrara en forma de sales dicromato, con el volumen del extracto utilizado en el ensayo se conseguiría una concentración en el cultivo del biosensor de 67 μM , que según los resultados mostrados anteriormente en la Figura 12F, correspondería a una activación del promotor de RecA de $\approx 150\%$, un valor similar al obtenido en el ensayo mostrado en la Figura 13A para esa concentración de dicromato puro. Siguiendo este mismo razonamiento, las cantidades de Cr presentes en las demás muestras sólo producirían ligeros incrementos en la actividad del promotor, como ocurrió realmente.

Por lo tanto, podemos concluir que el biosensor microbiano prRecA-Luc2 diseñado y validado en esta Tesis Doctoral también permite detectar en piensos o material agroalimentario agentes genotóxicos como el dicromato, que ejercen un daño directo sobre el ADN.

4.1.8. EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LOS ÁCIDOS BILIARES Y SU IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO DEL COLANGIOCARCINOMA.

El colangiocarcinoma (CGC) es un tipo de tumor hepático menos frecuente que el HCC, pero comparten características ya comentadas en la Introducción, como mortalidad e incidencia altas (Patel, 2006), detección tardía y una respuesta muy pobre

a terapias alternativas a la resección quirúrgica, como la radioterapia y la quimioterapia (Lazaridis, 2005). Esto ha llevado a muchos investigadores a desarrollar modelos experimentales de CGC, para conocer mejor la biología del tumor e identificar nuevos marcadores para un diagnóstico precoz que permita aumentar la supervivencia de los pacientes.

Su etiología no se conoce bien, aunque se sabe que algunos factores de riesgo son la colangitis esclerosante primaria, la hepatolitiasis, ciertas infecciones parasitarias hepáticas y la exposición a carcinógenos (de Groen, 1999). Todos ellos comparten la característica de provocar un cierto grado de daño hepático debido a colestasis o a inflamación. De hecho, el CGC suele estar relacionado con la colestasis crónica y, por otra parte, se sabe que la exposición a concentraciones elevadas de ácidos biliares podría estar asociada con una mayor incidencia de tumores gastrointestinales (Bernstein, 2009). Sin embargo, el papel de los ácidos biliares en el desarrollo del CGC no se conoce bien.

En nuestro laboratorio, la Dra. Elisa Lozano desarrolló un modelo experimental de CGC en ratas mediante la administración prolongada de tioacetamida (TAA), con el objetivo de investigar durante el desarrollo de su Tesis Doctoral el papel de los ácidos biliares acumulados en situaciones de colestasis en la progresión de la colangiocarcinogénesis. Como se indica en la figura en la que se representan parte de sus resultados obtenidos, se desarrollaron tumores hepáticos visibles en las ratas tratadas con TAA (Figura E.Lozano A) en los que se detectó por Western blot expresión de marcadores de células colangiolares como CK-7 y Claudina-4, GSTpi y el marcador de malignidad Neu (Figura E.Lozano B). La analítica de los parámetros bioquímicos en el suero de estos animales reveló, entre otros datos no mostrados, un marcado aumento de la colanemia según se indica en la Figura E.Lozano C. Se encontró una correlación entre los niveles de ácidos biliares en suero y el nivel de expresión de Claudina-4 (Figura E.Lozano D) en el hígado de las ratas pertenecientes a los distintos grupos experimentales, constatando que la acumulación crónica de ácidos biliares estimula la proliferación y favorece el desarrollo tumoral.

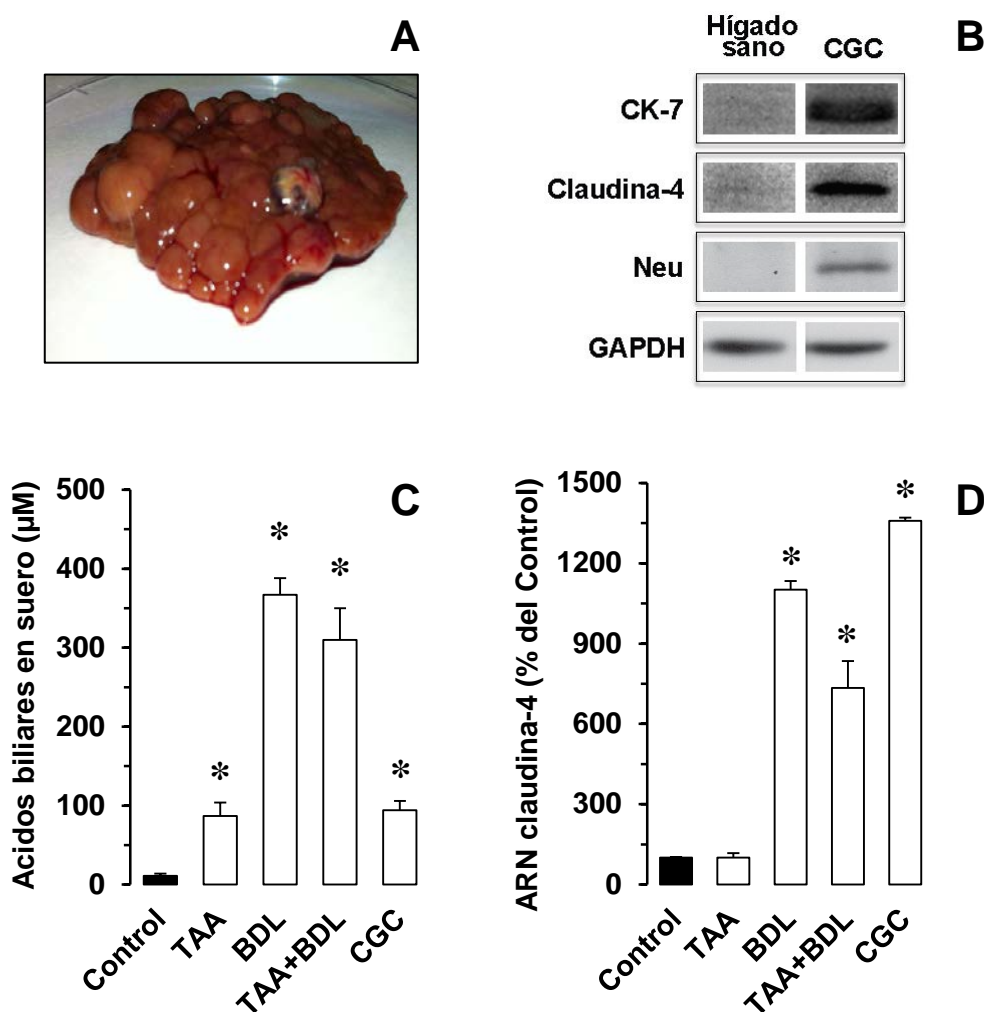


Figura representativa de los resultados obtenidos en la Tesis Doctoral de E. Lozano. (A) Imagen de tumores hepáticos observados en ratas tratadas con tioacetamida (TAA) durante 36 semanas. (B) Análisis por Western blot de marcadores de colangiocitos y colangiocarcinoma (CGC): citoqueratina 7 (CK-7), claudina-4 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico Neu. La GAPDH se utilizó como control de carga de proteína. Concentración de ácidos biliares en suero (C) y niveles del ARNm de claudina-4 determinados por RT-PCR cuantitativa (D) en hígado de ratas Control o tratadas durante 8 semanas con TAA, sometidas a ligadura del conducto biliar (BDL) o la combinación de TAA+BDL, o en CGC tras 36 semanas de tratamiento con TAA. *, $p < 0,05$, comparado con el grupo Control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En base a estos antecedentes, decidimos aplicar el ensayo de genotoxicidad basado en el uso del biosensor microbiano prRecA-Luc2 para estudiar si los ácidos biliares podrían tener un efecto genotóxico directo sobre las células colangiolares y, por tanto, esclarecer si el efecto de la acumulación de los ácidos biliares sobre la progresión del CGC es debido a que estas moléculas actúan como carcinógenos o cocarcinógenos.

Se decidió iniciar el trabajo evaluando el efecto genotóxico de algunos ácidos biliares considerados más tóxicos por poseer un carácter más hidrofóbico: ácidos desoxicólico (ADC), quenodesoxicólico (AQDC), glicoquenodesoxicólico (AGQDC) y litocólico (ALC). Con el objeto de utilizar concentraciones subtóxicas de estos ácidos biliares en el ensayo de genotoxicidad, se realizaron previamente estudios que nos permitieron determinar las concentraciones de estos compuestos que no eran tóxicas para las bacterias BL21(DE3) constituyentes del biosensor en las condiciones del ensayo (datos no mostrados), tomando la precaución en todo momento de no superar la concentración micelar crítica. De acuerdo a los resultados obtenidos, decidimos usar ADC, AQDC y AGQDC hasta una concentración de 1 mM, y el ALC hasta 0,3 mM.

En primer lugar se estudió el efecto del ADC sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2.

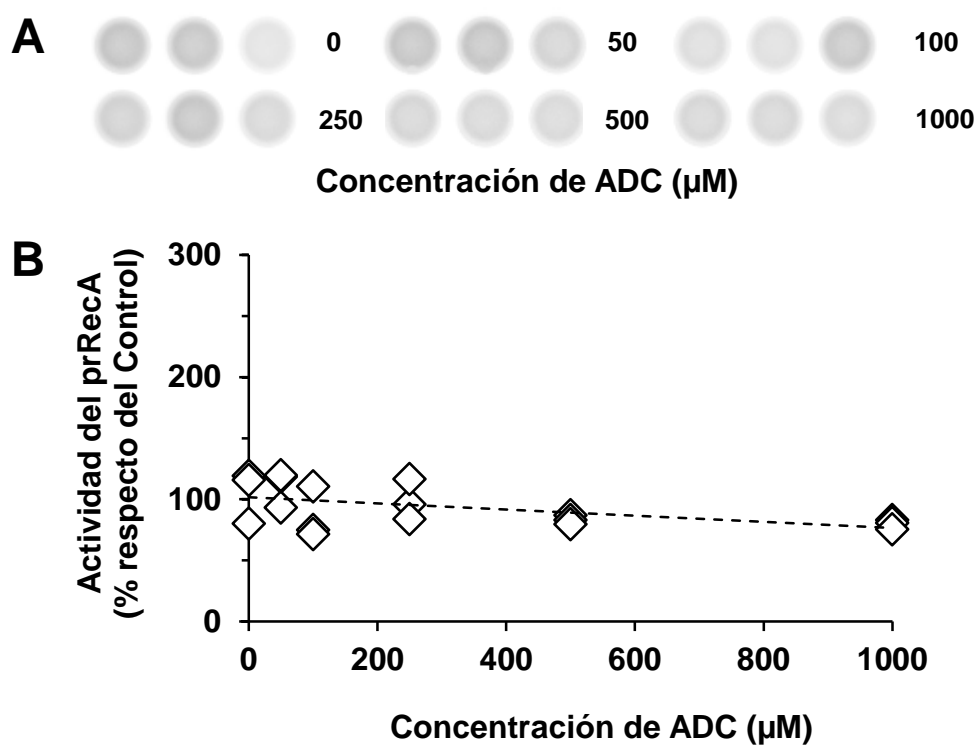


Figura 14. Imagen representativa (A) y representación gráfica (B) del efecto de diferentes concentraciones de ácido desoxicólico (ADC) sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2. Las bacterias constituyentes del biosensor se incubaron con ADC (50, 100, 250, 500 y 1000 μM) o sólo con el solvente (Control) durante 2,5 h en agitación a 37°C. Los resultados de luminiscencia se expresan en porcentaje respecto al Control y representan la media \pm EEM de un triplicado de muestras correspondientes a tres ensayos diferentes.

La Figura 14A muestra una imagen representativa de la intensidad de luz emitida por el biosensor y la Figura 14B la cuantificación de la actividad luciferasa regulada por

la actividad del prRecA frente a las distintas concentraciones de ADC ensayadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, este ácido biliar no fue capaz de inducir la actividad luciferasa del biosensor microbiano prRecA-Luc2 a las concentraciones ensayadas.

Tras comprobar que el ADC no ejercía un efecto genotóxico directo sobre el ADN, evaluamos si las otras especies moleculares de ácidos biliares tenían el mismo comportamiento. Tal y como se puede observar en la Figura 15, los ácidos biliares AQDC, AGQDC y ALC tampoco estimularon la actividad luciferasa del biosensor microbiano prRecA-Luc2 a ninguna de las concentraciones ensayadas.

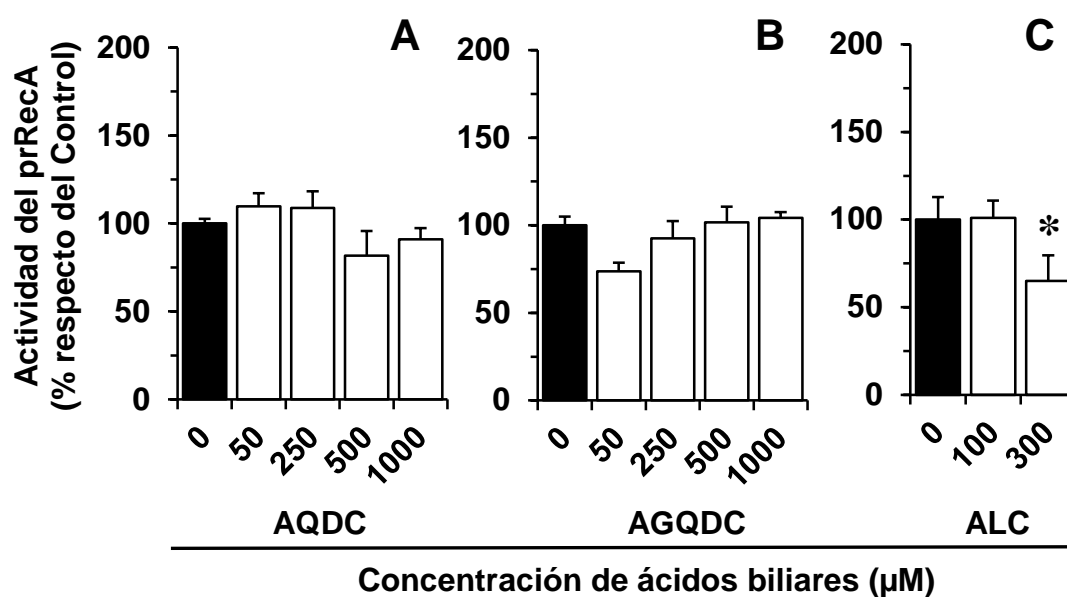


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de ácido quenodesoxicólico (AQDC) (A), glicoquenodesoxicólico (AGQDC) (B) y litocólico (ALC) (C) sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2. Las bacterias constituyentes del biosensor se incubaron con AQDC (50, 250, 500 y 1000 µM), AGQDC (50, 250, 500 y 1000 µM), ALC (100 y 300 µM) o sólo con el solvente (Control) durante 2,5 h en agitación a 37°C. Los resultados de luminiscencia se expresan en porcentaje respecto al Control y representan la media ± EEM de un triplicado de muestras correspondientes a tres ensayos diferentes. *, p<0,05, comparado con el Control por el test t para valores apareados.

A continuación, se evaluó la capacidad del AGQDC (un ácido biliar más hidrofóbico y tóxico) y del glicoursodesoxicólico (AGUDC) (un ácido biliar más hidrofílico y menos tóxico) para incrementar y reducir, respectivamente, el efecto genotóxico de un agente caracterizado como tal, para lo cual estos ácidos biliares fueron combinados con el cisplatino. Como se observa en la Figura 16, ni el AGQDC ni el AGUDC fueron capaces de modificar el incremento de la señal de luz emitida por el biosensor microbiano prRecA-Luc2 inducida por el cisplatino.

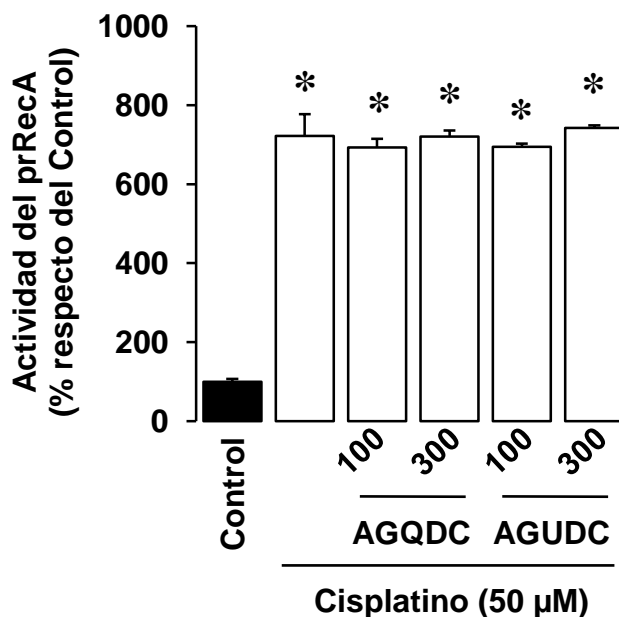


Figura 16. Evaluación de la capacidad de los ácidos glicoquenodesoxicólico (AGQDC) y glicoursodesoxicólico (AGUDC) para incrementar o prevenir la actividad genotóxica del cisplatino determinada a través del biosensor microbiano prRecA-Luc2. Las bacterias constituyentes del biosensor se incubaron con 50 μM de cisplatino con o sin 100 o 300 μM de AGQDC o AGUDC o sólo con el solvente (Control) durante 2,5 h en agitación a 37°C. Los resultados de luminiscencia se expresan en porcentaje respecto al Control, y representan la media \pm EEM de un triplicado de muestras correspondientes a tres ensayos diferentes. *, $p < 0,05$; comparado con el Control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

La tioacetamida (TAA), el compuesto que se utilizó para el desarrollo del modelo de colangiocarcinogénesis en rata, es un potente agente hepatotóxico y carcinógeno (Fitzhugh, 1948). Su hepatotoxicidad se produce tras la activación metabólica mediada por la enzima hepática CYP2E1 (Wang, 2000) y, en menor medida, por la enzima flavín monooxigenasa (Dashti, 1997), que genera un producto activo tras dos reacciones sucesivas: la conversión de la TAA en TAA-sulfóxido (TASO) y la transformación de este último en TAA-S,S-dióxido (TASO₂) (Hunter, 1977). TASO₂ es un metabolito reactivo muy inestable que se une de forma covalente a macromoléculas, generando aductos con las proteínas (Dyroff, 1981); además, dificulta la movilidad del ARN del núcleo al citoplasma e interfiere con la actividad ribosómica, impidiendo la síntesis proteica (Barker, 1974).

Investigamos la capacidad genotóxica de la TAA y/o de sus metabolitos reactivos responsable del desarrollo del CGC. Los metabolitos de TAA son compuestos altamente reactivos que no están disponibles comercialmente. Decidimos utilizar la capacidad metabólica de los hepatocitos para obtener una solución que contuviera dichos metabolitos tras exponer a estas células en cultivo primario a TAA. Se aislaron y

cultivaron hepatocitos de rata y se incubaron con concentraciones de TAA entre 5 y 75 μM durante 24 h, y, transcurrido ese tiempo, se lisaron. La capacidad genotóxica de la suspensión obtenida, que contenía los metabolitos de TAA, se evaluó a partir del biosensor prRecA-Luc2.

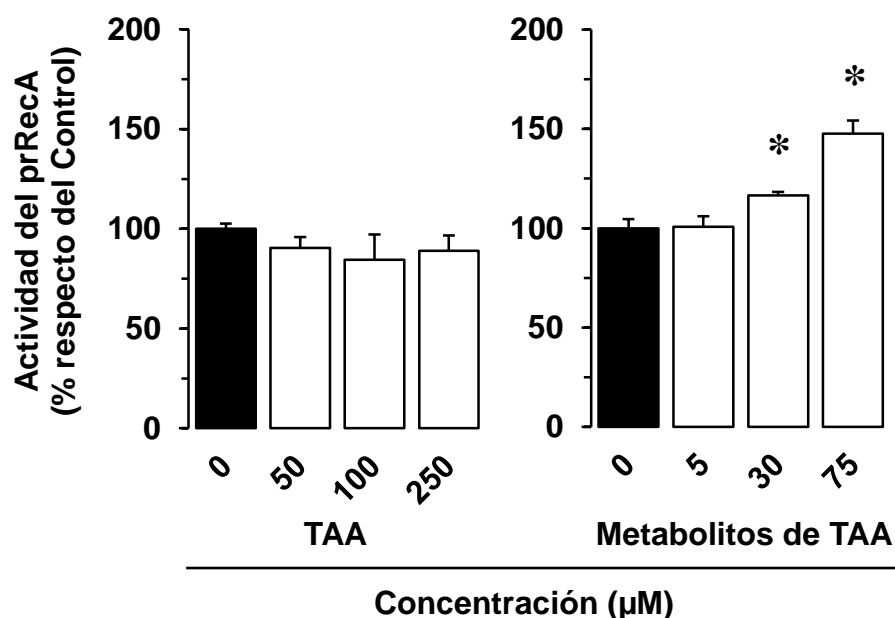


Figura 17. Efecto de la tioacetamida (TAA) y de lisados de hepatocitos expuestos a TAA durante 24 h sobre el biosensor microbiano prRecA-Luc2. Las bacterias constituyentes del biosensor se incubaron con TAA (50, 100 y 250 μM), lisados de hepatocitos en cultivo primario expuestos a TAA (5, 30 y 75 μM) o sólo con el solvente (Control) durante 2,5 h en agitación a 37°C. Los resultados de luminiscencia se expresan en porcentaje respecto al Control y representan la media \pm EEM de un triplicado de muestras correspondientes a tres ensayos diferentes. *, $p < 0,05$; comparado con el Control por el test t para valores apareados.

Como se observa en la Figura 17A, la TAA como tal no estimuló la actividad luciferasa del biosensor. Sin embargo, los metabolitos de TAA presentes en el lisado de hepatocitos previamente expuestos a la TAA incrementaron la señal de luz emitida por el biosensor (Figura 17B), lo cual indicaba que se estaba induciendo la respuesta SOS como consecuencia de un daño en el ADN.

Los resultados observados fueron consistentes con datos previos que indican que el taurocolato y el ADC por sí mismos no son capaces de inducir la respuesta SOS bacteriana (Nair, 2000), lo cual puede deberse a la falta de acción directa de los ácidos biliares sobre el ADN. Además, en estudios realizados *in vitro* utilizando líneas celulares e *in vivo* en ratas no se detectó la formación de aductos entre los ácidos biliares y el ADN (Hamada, 1994). Sin embargo, en otros ensayos de genotoxicidad bacterianos se

ha demostrado que los ácidos biliares a concentraciones muy altas (1-10 mM) potencian el efecto inducido por mutágenos (Nair, 2000). En este sentido, en un estudio *in vitro* llevado a cabo en colonocitos se describió que los ácidos biliares (ADC y AQDC) inducían daño en el ADN, aunque este efecto podría ser atribuido a la generación de estrés oxidativo causado por la elevada concentración de los ácidos biliares (600 μ M) usada en ese estudio (Hamada, 1994).

Nuestros resultados, utilizando varias especies moleculares de ácidos biliares a dosis subtóxicas (50 μ M) o moderadamente tóxicas (1000 μ M) apoyan el concepto de que un efecto genotóxico directo de los ácidos biliares que derive en la aparición de mutagénesis es poco probable. No obstante, podría existir una relación entre la colestasis crónica y el crecimiento y proliferación del CGC. La acumulación de ácidos biliares en el tejido hepático podría estimular el desarrollo del CGC por un papel co-carcinogénico favoreciendo la proliferación de los colangiocitos más que actuando como agentes carcinogénicos, ya que no se observa un daño directo de los ácidos biliares al ADN.

4.2. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR BASADA EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE MRP2 Y LA PROTEÍNA DE CAPTACIÓN DE FÁRMACOS OATP1B1

El carcinoma hepatocelular (HCC) representa casi el 85% de los tumores malignos primarios del hígado. Estudios epidemiológicos recientes revelan que este cáncer primario de hígado es el quinto tipo de tumor más común en el mundo, pero su mal pronóstico hace que sea la tercera causa de muerte relacionada con cáncer (Jemal, 2011).

Las opciones de tratamiento del HCC se pueden dividir en dos grupos: terapias quirúrgicas como la resección hepática, la crioablación y el trasplante de hígado; y terapias no quirúrgicas dirigidas al hígado (inyección percutánea de etanol, ablación por radiofrecuencia, quimioembolización arterial, radioterapia y radioembolización) o sistémicas (quimioterapia, terapia génica, inmunoterapia y terapia hormonal).

De los tratamientos descritos, la resección hepática es la principal opción curativa cuando el tumor es detectado en una etapa temprana (de Lope, 2012). Sin embargo, el HCC suele diagnosticarse tardíamente, cuando ya sólo pueden utilizarse tratamientos alternativos no quirúrgicos. Algunos de ellos, como la embolización arterial, la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia hormonal, son muy poco eficaces (de Lope, 2012). En situaciones en las que los tratamientos convencionales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia han fracasado, la terapia génica, que permite modificar genéticamente las células tumorales, se plantea como una esperanza terapéutica que ha suscitado grandes expectativas para el tratamiento del HCC en el futuro (Ortiz, 2012).

Una de las principales causas que limitan la eficacia de la quimioterapia es el desarrollo de resistencia tumoral (Marin, 2009). De hecho, los tumores hepáticos se encuentran entre los que mayor refractividad presentan al tratamiento farmacológico (Marin, 2010). A pesar de la gran variedad de fármacos antineoplásicos disponibles en la actualidad, su eficacia en el tratamiento del HCC es muy baja. La resistencia simultánea de las células tumorales a un amplio espectro de fármacos con diferente estructura y mecanismo de acción es responsable del fenotipo MDR. Esta resistencia tiene un origen multifactorial y engloba diferentes mecanismos (MOC) que se pueden clasificar en cinco grupos según se describió en el apartado de Introducción.

Entre los mecanismos englobados en el MOC-1b cabe destacar la sobreexpresión del gen *ABCC2*, el cual codifica para la proteína de membrana MRP2. Entre otros tejidos, MRP2 presenta una mayor expresión en el hígado sano, localizándose en la membrana apical de los hepatocitos (Nies, 2007) donde desempeña un papel fundamental en la función hepática de detoxificación, mediando la excreción a la bilis de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos (Jedlitschky, 2006), entre los que se incluyen diferentes fármacos antitumorales como el cisplatino (Nies, 2007). El tratamiento de los pacientes con fármacos antitumorales estimula la expresión de bombas exportadoras ABC (Gillet, 2007); de ahí la gran relevancia clínica de la MRP2, por su capacidad para conferir resistencia, tanto intrínseca como adquirida, a una gran variedad de fármacos antitumorales en tumores sólidos (Haimeur, 2004), lo cual compromete el éxito de los tratamientos quimioterapéuticos.

En los últimos años, se han desarrollado diferentes estrategias que permiten la reversión de la quimiorresistencia generada por la sobreexpresión de proteínas ABC: modificaciones químicas de los fármacos que impiden su reconocimiento por las bombas exportadoras, encapsulación en liposomas de los fármacos antitumorales, muerte celular por inmunotoxinas dirigidas a la proteína que se sobreexpresa y el bloqueo o inhibición selectiva de la proteína responsable del fenotipo MDR (Folmer, 2007).

Otras estrategias desarrolladas van orientadas a superar limitaciones de la quimioterapia, como su inespecificidad y su toxicidad. Fundamentalmente, se basan en el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos y su vectorización para que presenten máxima eficacia y mínimos efectos secundarios. En ese sentido, el hepatotropismo de los ácidos biliares hace que en condiciones fisiológicas normales se encuentren en gran medida reclusos en la circulación enterohepática. Esta propiedad permite utilizar a estas moléculas como lanzaderas o caballos de Troya para dirigir ciertos fármacos hacia el tejido hepático (Briz, 2002). Nuestro grupo ha sintetizado y llevado a cabo la caracterización de una línea de compuestos, en el campo de la química bioinorgánica, que denominamos genéricamente Bamet (de "bile acid"+"metal") (Criado, 1997).

Estos compuestos presentan dos características estructurales comunes: una región molecular similar a un ácido biliar y un átomo de un metal como el Pt(II). De esta manera mantienen parte de la capacidad citostática conferida por el Pt(II) junto a las propiedades organotrópicas propias de los ácidos biliares (Criado, 1997). El compuesto cabeza de serie de esta familia es el Bamet-R2 formado por la unión del cisplatino con el grupo carboxílico del AGC (Criado, 1997). Las modificaciones hechas en la estructura del Bamet-R2 para alargar o acortar la distancia entre la molécula del ácido biliar y el átomo

de Pt(II) llevó al desarrollo de nuevos compuestos pertenecientes a esta familia como el Bamet-UD2 (Criado, 2000), que está formado por la unión de dos moléculas de AUDC al cisplatino y es el derivado, de los sintetizados hasta el momento, que presenta mayor actividad antitumoral y menores efectos tóxicos inespecíficos (Dominguez, 2001).

Entre las proteínas transportadoras que se localizan en la membrana basolateral de los hepatocitos y se expresan de forma casi exclusiva en el hígado se encuentran algunos miembros de la familia OATP, como OATP1B1 y OATP1B3. Se encargan del transporte de un amplio rango de compuestos endógenos, como los ácidos biliares, y xenobióticos, entre los que se encuentran diferentes fármacos antitumorales. En el caso del HCC se ha encontrado una reducción de la expresión de OATP1B1 y OATP1B3 (Kullak-Ublick, 1996).

Planteamos como uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral, desarrollar una estrategia de terapia génica basada en la quimiosensibilización de células tumorales resistentes mediante la introducción en las mismas de un ADN quimérico que contenga la secuencia codificante de una proteína de captación de fármacos citostáticos, como OATP1B1, bajo el control del promotor de una proteína de resistencia, como MRP2. De esta manera la regulación de OATP1B1 mediada por el promotor del gen *ABCC2* daría lugar a un incremento de su expresión, aumentando la captación de los agentes antitumorales sustratos de la misma y, por lo tanto, la eficacia del tratamiento farmacológico. Esta estrategia se podría combinar con la utilización de fármacos citostáticos conjugados con ácidos biliares, que pudieran ser reconocidos por sistemas de transporte como el OATP1B1, y de esta forma incrementar su vectorización hacia tejidos del sistema hepatobiliar.

4.2.1. ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE MRP2 EN CÉLULAS ALEXANDER

Se seleccionó la línea celular Alexander, de hepatoma humano, para evaluar la estrategia quimiosensibilizante planteada y se comenzó determinando la actividad transcripcional del promotor del gen *ABCC2* (prMRP2) en estas células.

Para ello se usaron plásmidos clonados por la Dra. Elisa Herráez en un trabajo previo, que contenían diferentes regiones del prMRP2 controlando la expresión de la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga o *Luc2* (Figura 18A) (Herraez, 2012). La región que denominamos Z1-prMRP2 comprendía la secuencia completa del promotor; una zona de 2899 pb en dirección 3'-5' respecto al codón de inicio del gen,

identificada por algunos autores como el promotor de *ABCC2* (Tanaka, 1999) y que estaba registrada en la base de datos GenBank con el número de acceso AF144630. Los fragmentos que denominamos Z2-prMRP2 y Z3-prMRP2 estaban constituidos por secuencias parciales del prMRP2 de 1423 pb y 873 pb respectivamente, obtenidas por acortamiento parcial del extremo 5' de Z1-prMRP2.

Las células Alexander se transfectaron con los plásmidos citados, cada uno de los cuales contenía las construcciones esquematizadas en la Figura 18A, que permitirían determinar la actividad de cada una de las regiones del prMRP2 que controlaban la expresión de *Luc2*, a partir de los resultados de emisión de luz obtenidos. Del mismo modo, las células también se transfectaron con un plásmido utilizado como control positivo, en el que la expresión de *Luc2* era regulada por el promotor del citomegalovirus (prCMV), que se caracteriza por ser un promotor muy activo y dirigir una expresión génica constitutiva en células de mamífero, y con otro plásmido en el que la actividad luciferasa no se encontraba controlada bajo la acción de ningún promotor y serviría como control negativo para determinar la expresión inespecífica del gen *reporter*. Como era de esperar, observamos un nivel de luminiscencia elevado en las células en las que la luciferasa se expresaba bajo la acción del prCMV (Figura 18B), mientras que apenas se apreció señal lumínica en el caso de las células transfectadas con *Luc2* sin promotor (Figura 18B). La señal de luz obtenida en el caso de Z1-prMRP2, que incorpora la secuencia completa del promotor, fue del mismo orden de magnitud, aunque cuantitativamente inferior, que la generada por la luciferasa regulada por el prCMV, lo que sugiere que prMRP2 es un promotor con una marcada actividad transcripcional en estas células de origen hepático. La región de menor tamaño Z3-prMRP2 presentó una actividad similar a Z1-prMRP2, mientras que Z2-prMRP2 fue el fragmento que confería menor actividad transcripcional.

La expresión de MRP2 se modifica en respuesta a compuestos endógenos y xenobióticos estructuralmente muy diferentes, como el cisplatino y la dexametasona (Nies, 2007). Este glucocorticoide es un inductor típico de la expresión de MRP2 por ser un agonista del receptor de glucocorticoides, cuyos sitios de unión en la secuencia del prMRP2, que aparecen indicados en la Figura 18A, se han identificado en estudios previos (Qadri, 2009; Stockel, 2000). Por ello, se eligió la dexametasona para estudiar su efecto inductor sobre las distintas regiones Z1, Z2 y Z3 del prMRP2, en las mismas células Alexander transfectadas con los plásmidos a los que nos hemos referido anteriormente. Se observaron incrementos significativos y de magnitud similar de la señal de luminiscencia por la acción de la dexametasona sobre las secuencias total y

parciales del prMRP2 (Figura 18B). Sin embargo, no se apreciaron cambios en la expresión de la luciferasa en las células transfectadas con los plásmidos prCMV-Luc2 y Luc2 sin promotor.

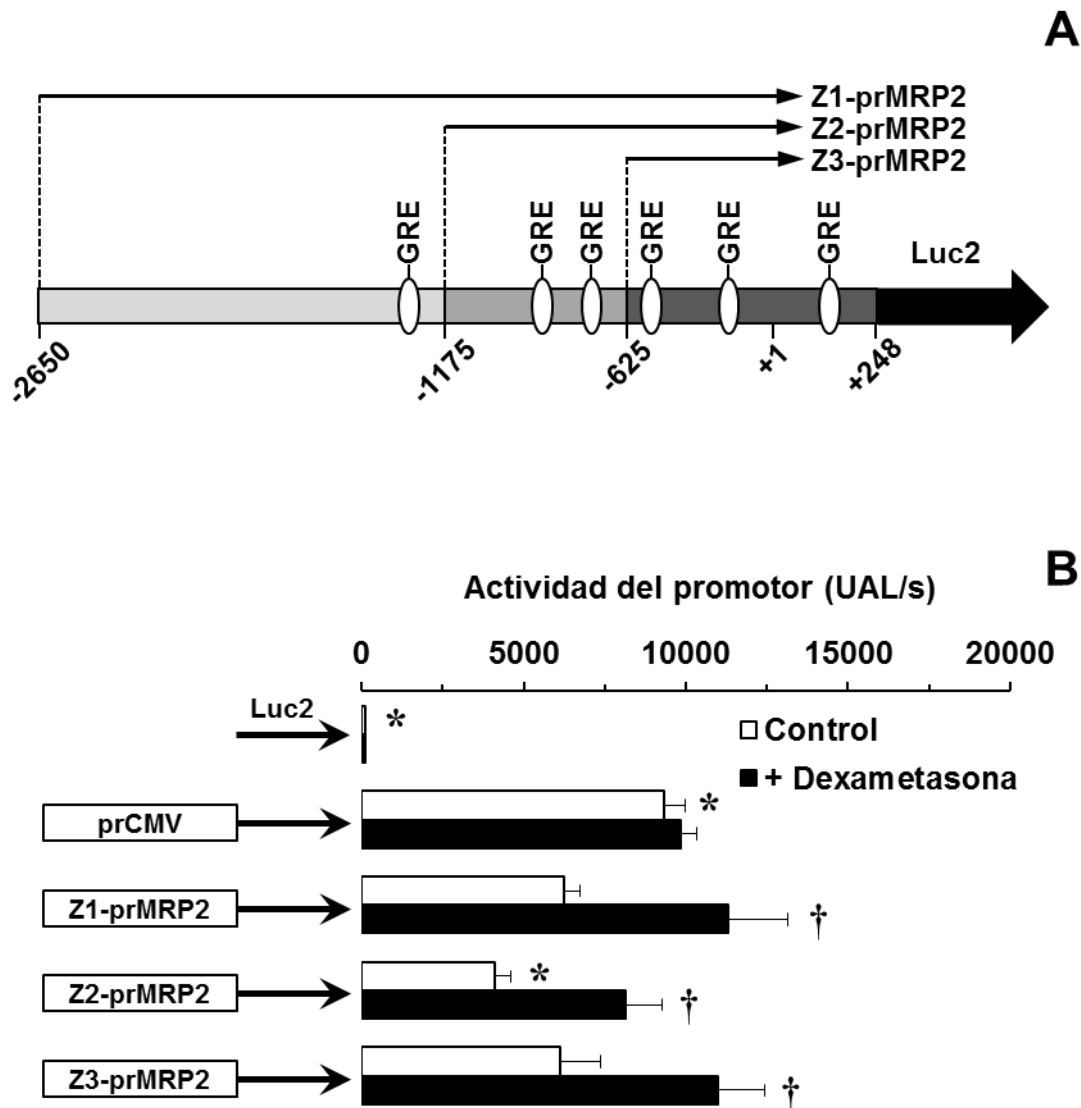


Figura 18. (A) Esquema representativo de las regiones Z1, Z2 y Z3 del promotor de MRP2 (prMRP2) que precedían al gen *reporter* de la luciferasa de luciérnaga (*Luc2*) en los vectores de expresión usados en el estudio de la actividad del prMRP2. Los números situados en la parte inferior representan la posición de los nucleótidos respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1). En blanco se representan los sitios de unión del receptor de glucocorticoides (GRE) encontrados a lo largo de la secuencia del prMRP2. (B) Actividad luciferasa no regulada por promotor y regulada por la actividad de diferentes promotores (prCMV, Z1-, Z2- y Z3-prMRP2) en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con los plásmidos correspondientes y tratadas con dexametasona o no tratadas (Control). A las 48 h después de la transfección las células se incubaron con 100 nM de dexametasona (barras negras) o solo con el solvente DMSO (barras blancas) durante 24 h y se midió la actividad de la luciferasa. La señal de luminiscencia se expresó como unidades arbitrarias de luz (UAL)/s. Los valores representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con Z1-prMRP2. †, $p < 0,05$, comparado con el Control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En un trabajo previo de evaluación de la actividad del prMRP2 en células de adenocarcinoma colorrectal humano llevado a cabo en nuestro laboratorio, usando los mismos plásmidos descritos en este trabajo, se observó en condiciones basales de no estimulación del prMRP2, una mayor actividad transcripcional de Z3-prMRP2 con respecto a Z1-prMRP2 y, al igual que en las células de hepatoma humano, una menor activación de la región Z2-prMRP2. También se describió que la actividad transcripcional de Z1-prMRP2 y de la región promotora Z3-prMRP2 se inducía de manera significativa por la acción del cisplatino (Herraez, 2012).

Con los resultados obtenidos deducimos que el prMRP2 resulta muy activo en células Alexander y es estimulable por la acción de un inductor típico de MRP2 como es la dexametasona. En base a los mismos, elegimos la secuencia parcial Z3 del prMRP2 para construir un gen quimérico quimiosensibilizante, ya que aunque presenta un nivel de actividad transcripcional y de inducción muy similar a Z1-prMRP2, pensamos que por el hecho de poseer un tamaño menor favorecería tanto el proceso de clonación como la incorporación del gen quimérico al interior celular.

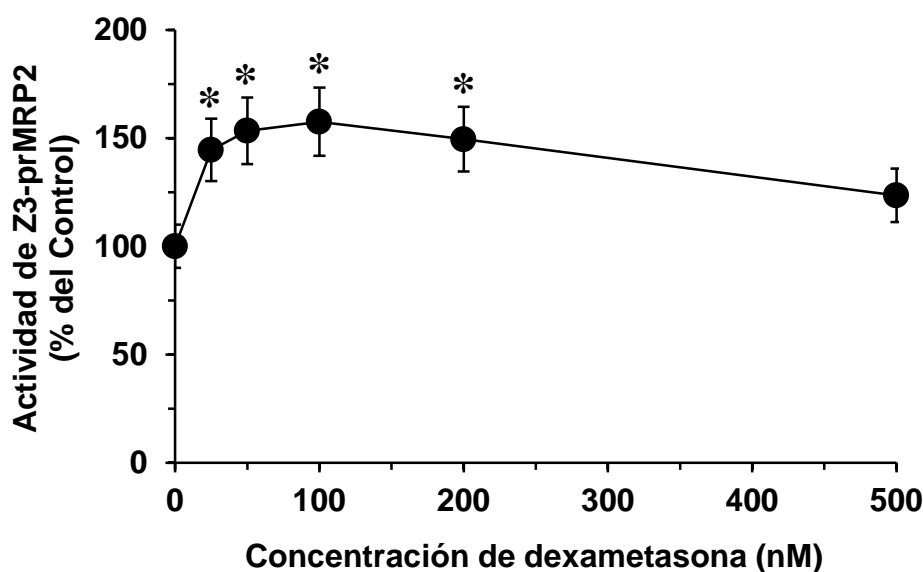


Figura 19. Efecto de la dexametasona sobre la actividad de la región promotora Z3-prMRP2 en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con el plásmido que contenía Z3-prMRP2 controlando la expresión de la luciferasa. Transcurridas 48 h desde la transfección, las células se incubaron con dexametasona (25, 50, 100, 200 y 500 nM) o solo con el vehículo DMSO (Control) durante 24 h y se midió la actividad de la luciferasa. La señal de luminiscencia se expresó como porcentaje respecto al Control. Los valores representan la media \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con el Control por el test t de valores apareados.

Continuando con el análisis del efecto inductor de la dexametasona sobre el prMRP2, para elegir la concentración que produjera la máxima inducción de este promotor, se realizó un barrido de concentraciones del glucocorticoide en células Alexander transfectadas con el plásmido Z3-prMRP2-Luc2.

Como se observa en la Figura 19 la emisión de luz se incrementó en respuesta a concentraciones crecientes de dexametasona comprendidas en el rango de 0 y 100 nM, obteniéndose la máxima actividad de Z3-prMRP2 a 100 nM, concentración a partir de la cual el nivel de luminiscencia fue decreciendo progresivamente. Se eligió, por tanto, la concentración de 100 nM para conseguir la mayor inducción de la actividad de Z3-prMRP2 en experimentos posteriores.

4.2.2. CONSTRUCCIÓN DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1

El desarrollo de la estrategia de terapia génica se prosiguió con la fusión transcripcional de la región promotora Z3-prMRP2 con OATP1B1. Elegimos esta proteína para intentar restaurar su expresión en el HCC y su función de captación de diferentes fármacos antitumorales de acuerdo a la actividad del promotor indicado. Además, su uso favorece la posibilidad de aplicar tratamientos vectorizados.

Siguiendo el procedimiento experimental correspondiente a la clonación por recombinación Gateway, a partir de ARN de hígado humano se amplificó por RT-PCR de alta fidelidad la secuencia codificante de OATP1B1, flanqueada por sitios *attB5* y *attB2*, y se clonó en el vector donador pDONR221 P5-P2. La secuenciación del vector pEntry resultante reveló que la secuencia clonada se correspondía con la variante *SLCO1B1-1a*, que codifica la isoforma silvestre del OATP1B1, que es la que presenta una mayor actividad transportadora de los sustratos típicos de esta proteína (Tirona, 2001). Dos vectores pEntry que contenían Z3-prMRP2 y la secuencia codificante de OATP1B1 se recombinaron con el vector de destino pcDNA6.2-pL-V5-DEST, en el que se había eliminado el promotor que controlaba la expresión del gen que se deseaba clonar, obteniendo el vector de expresión que denominamos pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5, que incluía la secuencia codificante de OATP1B1 precedida en su extremo 5' de la región promotora Z3-prMRP2 y seguida en su extremo 3' de la secuencia que codifica para el epítipo V5, un pequeño fragmento de 15 aminoácidos que permite realizar marcajes de la OATP1B1 utilizando un anticuerpo anti-V5 (Figura 20). A lo largo del trabajo nos referiremos al gen clonado en el vector de expresión pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 como gen quimérico prMRP2-OATP1B1.

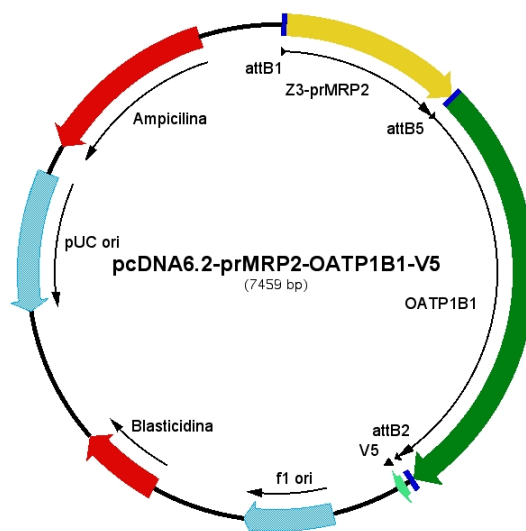


Figura 20. Esquema del vector de expresión obtenido por clonación por recombinación Gateway, que contenía la región Z3 del prMRP2 (Z3-prMRP2) controlando la expresión de la secuencia codificante de la proteína transportadora OATP1B1 y el epítipo V5. En color azul oscuro, flanqueando las secuencias citadas anteriormente, aparecen representadas las secuencias adaptadoras *att* que resultan necesarias en las recombinaciones durante la clonación del plásmido, en rojo los genes de resistencia a antibióticos y en azul claro los orígenes de replicación.

4.2.3. EXPRESIÓN DE OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA TRANSITORIA CON prMRP2-OATP1B1

En una primera aproximación de estudio del potencial de la quimera prMRP2-OATP1B1 se eligió la técnica de transfección transitoria usando lípidos catiónicos para introducir el gen quimérico en células tumorales Alexander, en las cuales habíamos confirmado la actividad transcripcional del prMRP2 y su capacidad para ser inducido.

Antes de iniciar los ensayos de funcionalidad de OATP1B1, consideramos importante conocer cómo evolucionaba el nivel de expresión de esta proteína de captación en las células a lo largo del tiempo, teniendo en cuenta que la técnica de transfección transitoria implica una pérdida de la expresión del transgén. Para ello, se determinó la abundancia del ARNm que se iba a traducir en OATP1B1 por RT-PCR cuantitativa en las células Alexander transfectadas con el plásmido pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 y en células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-Hygro(+), en el que no habíamos clonado ningún gen y al que denominamos vector “vacío”, que se usaron como control.

La expresión de OATP1B1 en estas células control fue despreciable respecto a la del hígado humano y no varió durante los días posteriores a la transfección génica (Figura 21). Sin embargo, las células que contenían la quimera prMRP2-OATP1B1 alcanzaron un nivel máximo de expresión de OATP1B1, del 211% respecto al hígado, a las 48 h desde la transfección, que se fue perdiendo progresivamente, siendo menor al 10% de la expresión de OATP1B1 en hígado a partir del quinto día tras la transfección. En el momento de máxima expresión, un grupo experimental de células fueron tratadas con el inductor dexametasona. Se observó un aumento de la abundancia del ARNm de OATP1B1 durante los 2 días posteriores al tratamiento con dexametasona en las células portadoras del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en comparación con esas mismas células tratadas sólo el vehículo. Este incremento fue del 280%, al día siguiente al tratamiento, y del 390%, 2 días después, respecto a las células no incubadas con dexametasona (Figura 21).

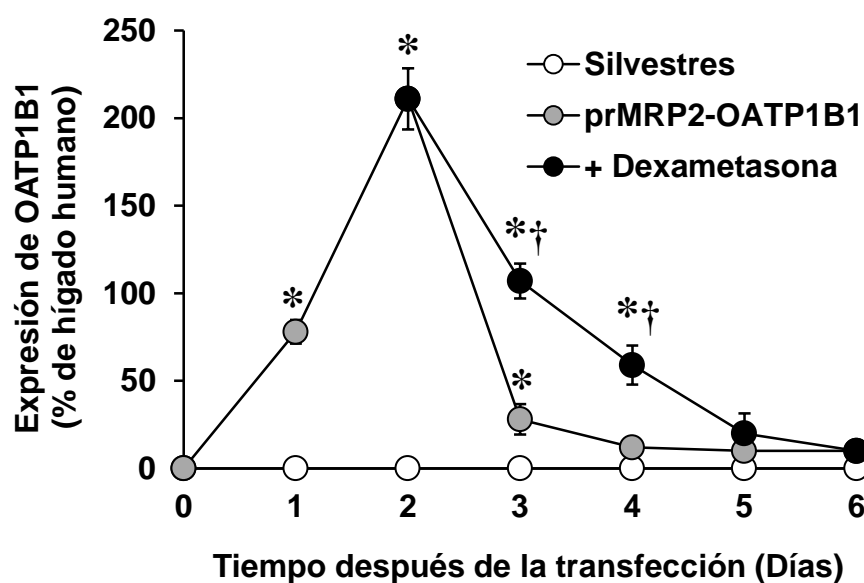


Figura 21. Evolución temporal de la abundancia de OATP1B1 determinada por RT-PCR cuantitativa en células Alexander transfectadas de forma transitoria con el gen quimérico prMRP2-OATP1B1 y tratadas o no con dexametasona. Las células Alexander se transfectaron con un vector “vacío” (silvestres) o con el plásmido pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 (prMRP2-OATP1B1) y, estas últimas, a los 2 días desde la transfección se trataron con dexametasona 100 nM o sólo con el vehículo DMSO. Los valores representan la media \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con las células silvestres. †, $p < 0,05$, comparado con las células transfectadas no tratadas con dexametasona por el test *t* de Student.

Observamos, por tanto, que la línea celular de hepatoma humano Alexander silvestre presentaba un nivel muy bajo de expresión de OATP1B1. Esto era de esperar, puesto que se ha encontrado una disminución de la expresión de transportadores de

aniones orgánicos colefílicos, como el OATP1B1, tanto en cáncer de hígado como en líneas celulares tumorales de origen hepático (Kullak-Ublick, 1996). Sin embargo, la expresión de OATP1B1 aumentaba de manera significativa tras la introducción del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 por transfección transitoria en los dos días posteriores. Además, el efecto inductor de la dexametasona sobre el prMRP2, analizado a partir de las 48 h desde la transfección, se manifestaba en un incremento significativo de la abundancia de OATP1B1 a nivel de ARNm prolongado hasta el quinto día desde la transfección.

Seguidamente, se procedió a medir la expresión de OATP1B1 a nivel de proteína por Western blot a partir de lisados de células Alexander silvestres y transfectadas con la quimera prMRP2-OATP1B1, que habían sido obtenidos tres días después de la transfección y tras 24 h de tratamiento o no con dexametasona. Se utilizó un anticuerpo frente al epítipo V5 para detectar la proteína OATP1B1-V5. Como control positivo del marcaje con V5 se usaron lisados de células Alexander que habían sido transfectadas en paralelo con las anteriores con un plásmido que contenía la secuencia codificante de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) controlada por el prCMV y etiquetada con V5.

En las células que contenían la quimera prMRP2-OATP1B1 se detectó expresión de OATP1B1 (Figura 22), más abundante cuando habían sido tratadas con dexametasona por su efecto inductor del prMRP2, mientras que en las células silvestres no se detectó expresión de OATP1B1; resultados que se corresponden con los ya obtenidos en la medida de la abundancia de ARNm de OATP1B1 por RT-PCR cuantitativa, que se mostraron en la Figura 21. No se detectaron cambios apreciables en la señal correspondiente a la GAPDH, utilizada como control de carga de proteínas (Figura 22). La mayor expresión detectada con el anticuerpo V5 ocurrió en el caso de las células transfectadas con el plásmido que contenía CAT-V5, probablemente debido a la diferencia de actividad de cada uno de los promotores y/o al grado de eficacia de la transfección.

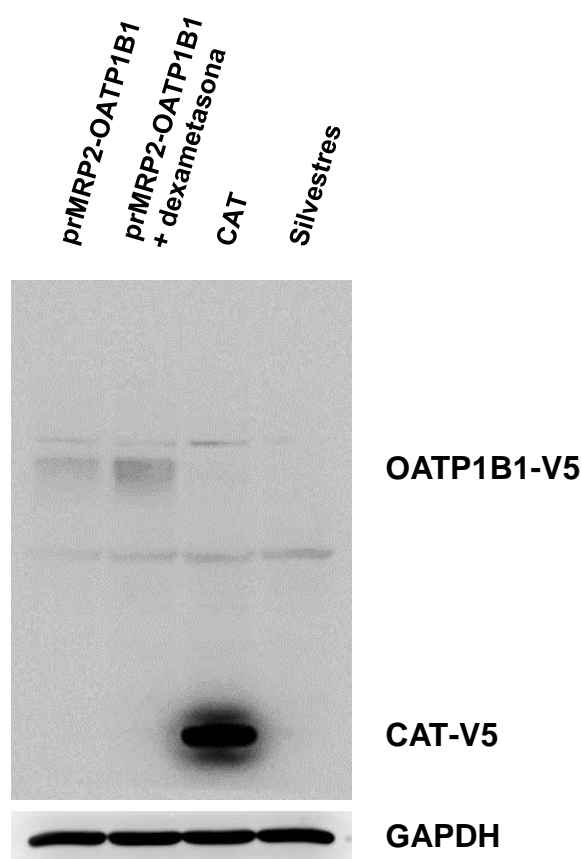


Figura 22. Western blot representativo de la proteína OATP1B1 etiquetada con V5 en lisados de células Alexander que expresaban *prMRP2-OATP1B1*, tratadas o no con dexametasona, y de células silvestres, usando un anticuerpo frente al epítipo V5. Las células se transfecaron con el plásmido *pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5*, a las 48 h desde la transfección se trataron con dexametasona o sólo con el vehículo DMSO durante 24 h y se obtuvieron los lisados celulares. Como control positivo del marcaje con el anticuerpo se usaron lisados de células que expresaban cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)-V5. La expresión de la GAPDH se utilizó como control de carga de las proteínas.

A continuación, se llevó a cabo un estudio por inmunofluorescencia para asegurarse de que la localización de la proteína transportadora de membrana OATP1B1 era la correcta mediante el marcaje de la misma con el mismo anticuerpo usado en el Western blot.

En la Figura 23A se muestra una imagen tomada tras el marcaje de células Alexander silvestres utilizando un anticuerpo frente a V5. Como cabía esperar, dada la baja expresión de OATP1B1 en estas células, no se detectó fluorescencia verde. Las células que expresaban CAT-V5 y que aparecen representadas en la Figura 23B, se usaron como control positivo de localización de una proteína citoplasmática y en ellas se detectó una señal fluorescente intensa en el citoplasma. En las células Alexander

fijadas a diferentes días después de la transfección con el plásmido pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5, los resultados de la inmunohistoquímica revelaron la localización de OATP1B1 en la membrana plasmática de aquellas células donde se expresaba (Figuras 23C-D).

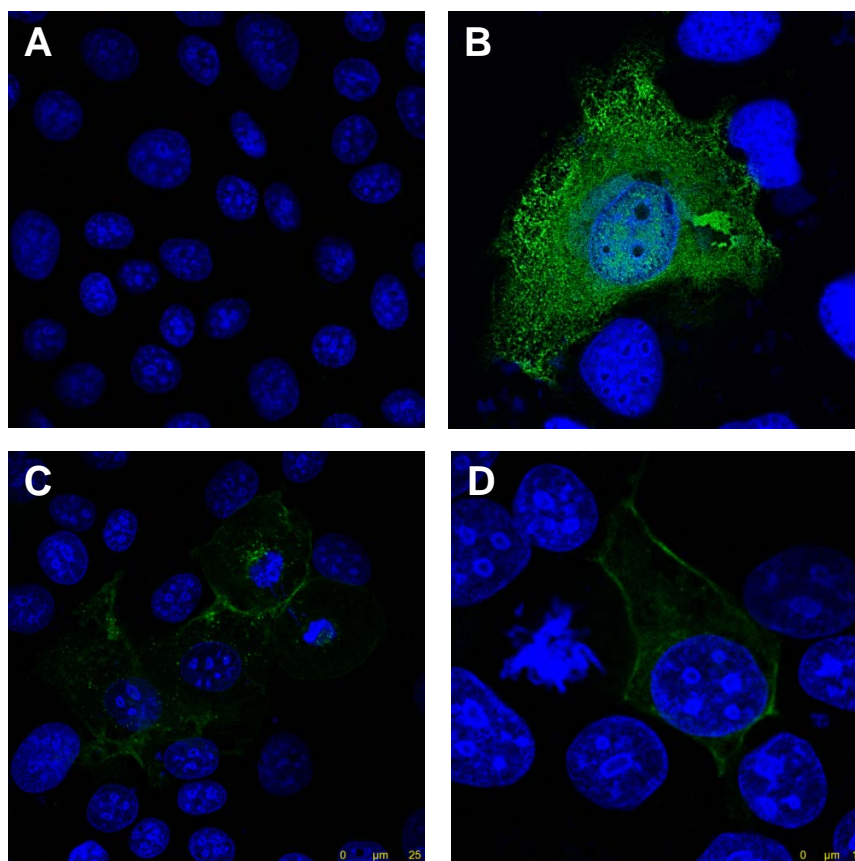


Figura 23. Localización por inmunofluorescencia de la proteína OATP1B1 etiquetada con V5 (en color verde) en células Alexander silvestres (A), células que expresaban cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)-V5 usadas como control positivo (B), y células transfectadas con el gen quimérico prMRP2-OATP1B1, 2 (C) o 5 (D) días después de la transfección. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (en color azul).

4.2.4. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA TRANSITORIA

Una vez comprobada la expresión y correcta localización de OATP1B1 en células Alexander transfectadas de forma transitoria con el gen quimérico prMRP2-OATP1B1, nos planteamos la evaluación de la quimera como estrategia farmacológica para la quimiosensibilización de células tumorales. Para ello, se decidió comparar el efecto citostático de diferentes fármacos antineoplásicos sobre células Alexander portadoras de prMRP2-OATP1B1 y células silvestres. Así, las células transfectadas de

forma transitoria con el plásmido pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 o con un vector "vacío" para usarlas como control, se expusieron a las 48 h desde la transfección (momento en el que se había observado un máximo de expresión de OATP1B1 a nivel de ARNm y una correcta localización de la proteína) a diferentes concentraciones de fármacos antineoplásicos, sustratos o no de OATP1B1, combinados o no con dexametasona. Se eligieron los siguientes fármacos antitumorales: paclitaxel (Svoboda, 2011) y los derivados de platino y ácidos biliares Bamet-R2 y Bamet-UD2 (Briz, 2002), cuyo transporte por OATP1B1 está bien descrito; y también cisplatino, que no es sustrato de OATP1B1 (Briz, 2002).

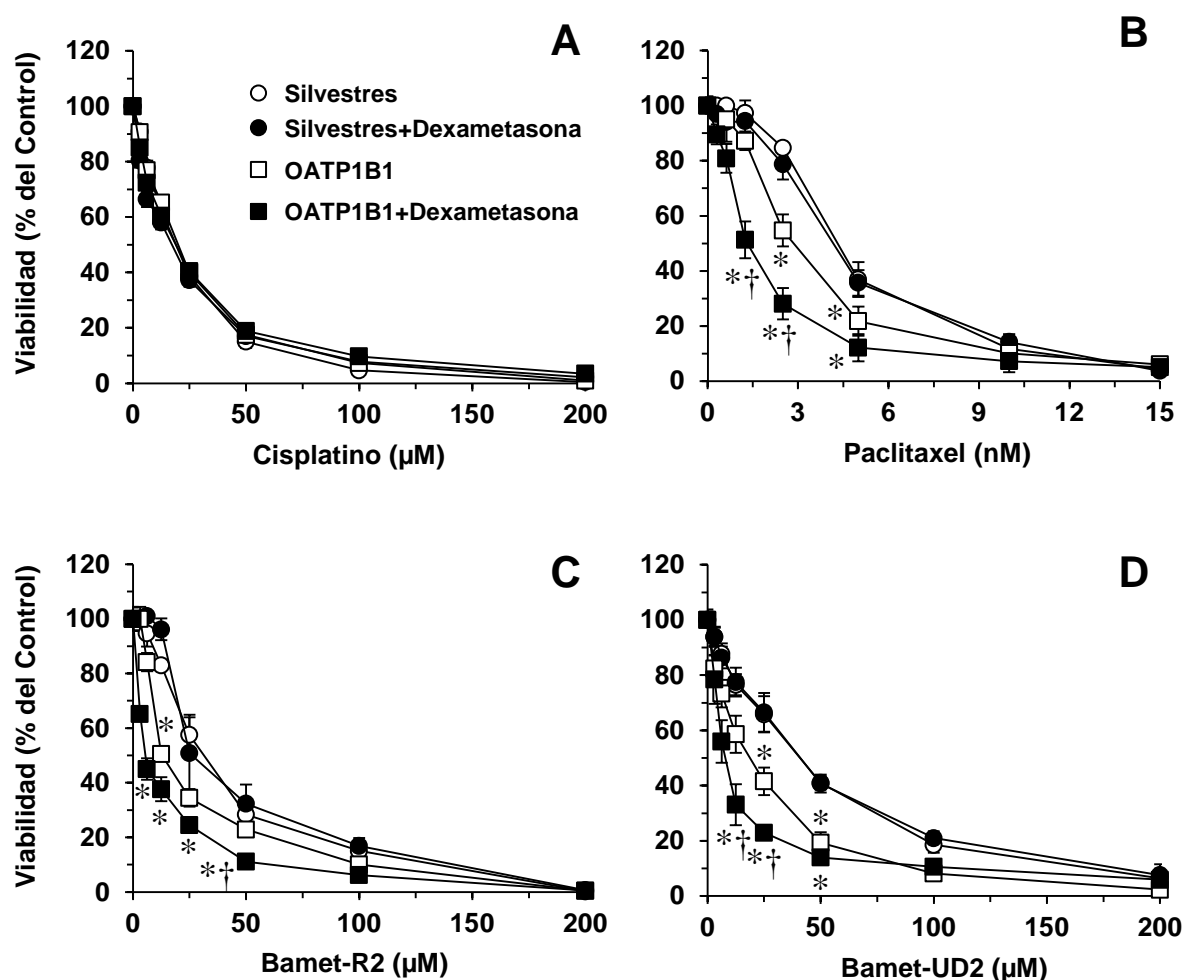


Figura 24. Efecto citostático del cisplatino (A) y de tres sustratos del OATP1B1, el paclitaxel (B) y los conjugados de cisplatino y ácidos biliares Bamet-R2 (C) y Bamet-UD2 (D), en células de hepatoma humano Alexander que expresaban prMRP2-OATP1B1 (OATP1B1) o silvestres. Las células transfectadas con un vector "vacío" (silvestres) o con pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 fueron expuestas a los distintos fármacos, con o sin 100 nM de dexametasona, durante 72 h a partir de las 48 h después de la transfección. Los valores se expresan como porcentaje del Control (100%) y son media \pm SD de 3 experimentos realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con las células silvestres. †, $p < 0,05$, comparando el mismo tipo de células no tratadas con dexametasona por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En la Figura 24A se observa el efecto antiproliferativo del cisplatino, que fue similar en los dos tipos celulares, independientemente del plásmido transfectado y del tratamiento con dexametasona. El efecto citostático del paclitaxel se muestra en la Figura 24B, el cual fue mayor en el caso de las células que expresaban OATP1B1 comparado con las silvestres y se vio potenciado aún más por la acción de la dexametasona. A concentraciones mayores de 10 nM ya no se observaron diferencias entre las diferentes condiciones. Las Figuras 24C y 24D ponen de manifiesto el efecto del Bamet-R2 y Bamet-UD2, respectivamente, observándose en ambos casos un comportamiento similar al descrito para el paclitaxel, una pérdida mayor de la viabilidad en las células que contenían prMRP2-OATP1B1 con respecto a las células control y la muerte celular se incrementaba aún más cuando las células que expresaban OATP1B1 eran tratadas con dexametasona. A concentraciones mayores de 100 μ M no se observaron diferencias entre las diferentes condiciones.

A partir de estas gráficas se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) para comparar mejor el efecto citostático de los diferentes compuestos y condiciones experimentales. Tal y como aparece indicado en la tabla 2, los valores de IC_{50} en el caso del cisplatino fueron similares en todos los grupos experimentales. Sin embargo, el tratamiento con paclitaxel, Bamet-R2 y Bamet-UD2, fármacos sustratos de OATP1B1, redujo de manera significativa el valor de la IC_{50} en las células portadoras de prMRP2-OATP1B1 con respecto a las células transfectadas con un vector “vacío” y dicho valor experimentó una disminución también significativa por el efecto inductor de la dexametasona sobre el prMRP2.

Tabla 2. Concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) del cisplatino y los sustratos del OATP1B1, Bamet-R2, Bamet-UD2 y paclitaxel, en células Alexander transfectadas transitoriamente con prMRP2-OATP1B1 (OATP1B1) o con un vector “vacío” (Silvestres).

| | Silvestres | Silvestres + Dexametasona | OATP1B1 | OATP1B1 + Dexametasona |
|-----------------------|---------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Cisplatino (μ M) | 19 \pm 3 | 17 \pm 0,2 | 20 \pm 2 | 19 \pm 0,2 |
| Bamet-R2 (μ M) | 31 \pm 1 | 26 \pm 0,5 | 12 \pm 1 ^a | 6,0 \pm 1 ^{a,b} |
| Bamet-UD2 (μ M) | 40 \pm 3 | 40 \pm 4 | 18 \pm 1 ^a | 8,0 \pm 1,5 ^{a,b} |
| Paclitaxel (nM) | 4,4 \pm 0,4 | 4,2 \pm 0,6 | 3,0 \pm 0,8 | 1,6 \pm 0,4 ^{a,b} |

48 h después de la transfección las células fueron expuestas al fármaco, con o sin 100 nM de dexametasona, durante 72 h. Los resultados representan la media \pm SD de tres cultivos diferentes. ^a, $p < 0,05$, comparado con las células silvestres; ^b, $p < 0,05$, comparado con el mismo tipo de células no tratadas con dexametasona por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Los resultados obtenidos demuestran que el gen quimérico prMRP2-OATP1B1 es funcional en este tipo de células en las que se ha comprobado que el prMRP2 es activo transcripcionalmente e inducible por la acción de la dexametasona. Este tratamiento de terapia génica en células de hepatocarcinoma humano, combinado con quimioterapia basada en la administración de fármacos antitumorales sustratos de OATP1B1, reduce la viabilidad de las células tumorales y, en mayor medida, cuando se administra también dexametasona, por su efecto inductor de la OATP1B1 regulada por el prMRP2.

El efecto diferencial entre las células que expresaban el transportador OATP1B1 y las que no, se observaba mejor a concentraciones bajas. A partir de las concentraciones de 50 μ M de Bimet-R2 y Bimet-UD2 y de 5 nM de paclitaxel, el efecto terapéutico del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 quedaba enmascarado por la propia toxicidad de las concentraciones ensayadas sobre las células de forma independiente del transportador, ya que llegaban a causar una pérdida prácticamente total de la viabilidad tanto de las células silvestres como las portadoras de prMRP2-OATP1B1. En estas condiciones, tras 72 h de exposición de las células y a las concentraciones altas ensayadas, los fármacos antitumorales mostraban un efecto tóxico e inespecífico sobre las células.

4.2.5. EFECTO DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 INTRODUCIDO DE FORMA TRANSITORIA EN CÉLULAS TUMORALES QUIMIORRESISTENTES

El siguiente paso fue investigar el efecto quimiosensibilizante del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en células tumorales caracterizadas por haber desarrollado resistencia a la quimioterapia a través del mecanismo de sobreexpresión de MRP2, sin usar la dexametasona para comprobar el efecto inductor del prMRP2.

En nuestro laboratorio se había generado una línea celular de adenocarcinoma de colon parcialmente resistente al cisplatino (LS174T/R), cuyo patrón de expresión génica había sido determinado previamente (Briz, 2003). Entre los genes de resistencia analizados destacó *ABCC2*, que codifica para MRP2, por su nivel de expresión elevado, con un incremento de 353 veces respecto a las células silvestres como consecuencia de la exposición a cisplatino (Herraez, 2012). La correlación entre los niveles de expresión de MRP2 en tumores hepáticos y gastrointestinales y la sensibilidad al cisplatino está bien descrita (Hinoshita, 2000; Kool, 1997). Aprovechando la

sobreexpresión de MRP2 en estas células resistentes, quisimos evaluar el efecto sobre las mismas de la herramienta génica prMRP2-OATP1B1.

En primer lugar, se analizó por RT-PCR cuantitativa la evolución temporal de la expresión de OATP1B1 en la línea celular LS174T silvestre y en la sublínea LS174T/R derivada de ésta, tras su transfección transitoria con la quimera prMRP2-OATP1B1 o con un vector “vacío”, como grupo experimental control.

Según muestra la Figura 25 apenas se detectó expresión de OATP1B1 en ambas líneas celulares transfectadas con el vector “vacío”. Sin embargo, sí se observaron cambios en el nivel de abundancia del ARNm de OATP1B1 a lo largo del tiempo en cada tipo celular que contenía prMRP2-OATP1B1, pero siguiendo un patrón diferente.

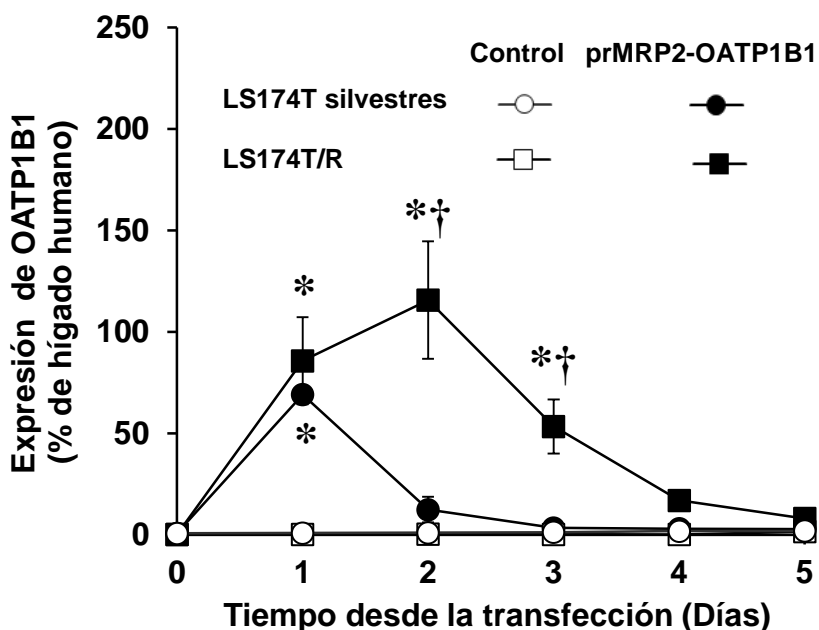


Figura 25. Evolución temporal de la abundancia del ARNm de OATP1B1 determinada por RT-PCR cuantitativa en células LS174T silvestres y LS174T/R transfectadas de forma transitoria con el plásmido pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 (prMRP2-OATP1B1) o con un vector “vacío” (Control). Los valores representan la media \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con el Control de cada tipo celular. †, $p < 0,05$, comparado con las células silvestres, por el test t de Student.

Hay que tener en cuenta que en el proceso de extracción y purificación del ARN total se pueden arrastrar moléculas de los plásmidos internalizados en las células con la transfección transitoria, que distorsionan al alza la cuantificación de la expresión génica por PCR. Para simplificar el proceso, y asumiendo el hecho comentado anteriormente

de sobreestimar el nivel de expresión, decidimos no incluir un tratamiento con la enzima de restricción *DpnI* de este tipo de muestras una vez concluida la RT, cuyo fundamento se describió en Material y Métodos, para eliminar el ADN plasmídico de procedencia bacteriana, metilado, pero no el ADNc producido en la reacción de RT.

La cantidad de ADNc de OATP1B1 en las células LS174T silvestres que contenían el gen prMRP2-OATP1B1 mostró un máximo a las 24 h desde la transfección, que, aunque fue mucho mayor que la de las células silvestres usadas como control, no superó el nivel de expresión de dicha proteína en hígado humano. A partir del día 2 desde la transfección los niveles de ADNc de OATP1B1 en estas células se redujeron marcadamente, hasta niveles similares a los de las células silvestres control. Por su parte, en las células LS174T/R la cantidad de ADNc de OATP1B1 se vio aumentada de forma significativa los tres días posteriores desde la transfección en comparación con esas mismas células transfectadas con el vector “vacío”. Se obtuvo un máximo en las células transfectadas con prMRP2-OATP1B1 a las 48 h desde la transfección, que alcanzó el 116% respecto al hígado humano, y que se iba reduciendo con el tiempo.

Los resultados obtenidos en esta primera aproximación sugieren que la expresión de la proteína OATP1B1 regulada por el prMRP2 en la línea celular LS174T/R está estimulada por el propio mecanismo de sobreexpresión de MRP2 desarrollado en estas células como consecuencia de la resistencia adquirida al cisplatino, al contrario que en las LS174T silvestres, caracterizadas por una expresión basal del gen *ABCC2* baja.

También se analizó la expresión de OATP1B1-V5 por Western blot en lisados de células LS174T silvestres y LS174T/R transfectadas o no con el plásmido pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 (Figura 26). Como control positivo del marcaje del anticuerpo usado frente a V5, se incluyeron lisados de células transfectadas con un plásmido que contenía CAT-V5 bajo la expresión del prCMV y se observó expresión de esa proteína en ambas líneas celulares. En cambio, no se detectó la proteína OATP1B1-V5 en las células silvestres y resistentes transfectadas con la quimera prMRP2-OATP1B1, al igual que en las células sin transfectar. No se observaron cambios de expresión en la GAPDH utilizada como normalizador.

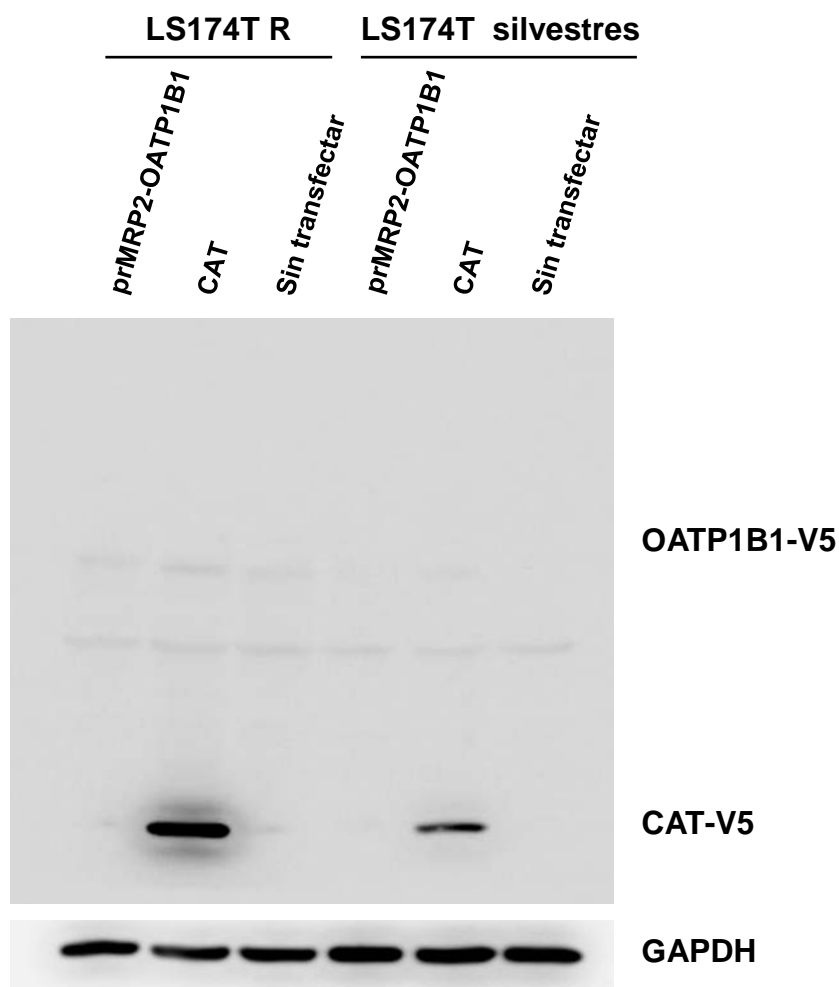


Figura 26. Western blot representativo de la proteína OATP1B1 etiquetada con V5 en lisados de células LS174T silvestres y LS174T/R transfectadas con *prMRP2-OATP1B1* y sin transfectar usando un anticuerpo frente al epítipo V5. Las células se transfectaron con el plásmido *pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5* y fueron lisadas a las 48 h desde la transfección. Como control positivo del marcaje con el anticuerpo se usaron lisados de células que expresaban cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)-V5. La expresión de la GAPDH se utilizó como control de carga de las proteínas.

Se llevaron a cabo en paralelo estudios de inmunofluorescencia con células LS174T silvestres y resistentes transfectadas con *pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5* que habían sido fijadas a las 48 h desde la transfección. No se observaron células LS174T silvestres que expresaran OATP1B1 (datos no mostrados) y se encontró un número minoritario de células LS174T/R fluorescentes verdes que expresaban la proteína en la membrana plasmática (Figura 27).

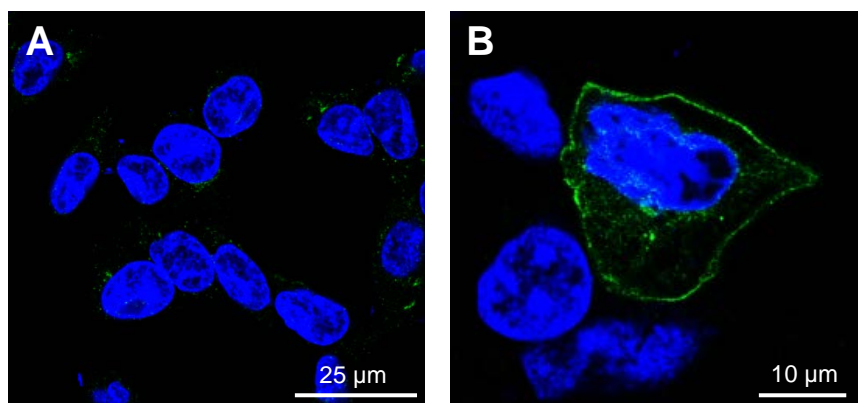


Figura 27. Inmunofluorescencia de la proteína OATP1B1 etiquetada con V5 (en color verde) en células LS174T/R transfectadas con el gen quimérico prMRP2-OATP1B1 2 días después de la transfección. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (en color azul).

El hecho de encontrar un número tan bajo de células fluorescentes que expresaban la proteína explica que no detectemos por Western Blot la expresión de OATP1B1 (Figura 26) y, probablemente, se deba a una baja eficacia de la transfección de la quimera prMRP2-OATP1B1 en estas líneas celulares, aunque fue suficiente para detectar un mayor nivel de expresión de OATP1B1 en LS174T/R a nivel génico (Figura 25). Niveles tan bajos de expresión de esta proteína de captación no permitían evaluar la eficacia de la estrategia quimiosensibilizante planteada en células tumorales resistentes, por lo que necesitábamos mejorar la eficacia de incorporación del transgén al interior celular.

4.2.6. DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS RECOMBINANTES prMRP2-OATP1B1

Nos planteamos el uso de lentivirus como sistema de liberación del gen quimérico de interés en las células tumorales por su capacidad para integrar el transgén en el genoma de la célula hospedadora, lo cual asegura estabilidad y permanencia de su expresión y porque, en general, el rendimiento de transducción es superior al obtenido con las técnicas de transfección transitoria. Además, cuando se incluye en el genoma del lentivirus un gen *reporter* fluorescente como la GFP, este sistema facilita la selección de clones con un alto nivel de expresión del transgén sin necesidad de trabajar en condiciones de selección por antibióticos citotóxicos. La elección de este tipo de vector viral con respecto a otros está basada en las ventajas que presentan los lentivirus: son capaces de infectar a células de manera independiente del estado del

ciclo celular, tanto que estén o no en división; admiten insertos de un tamaño importante (>8 kb) y se integran en el genoma de la célula huésped.

En nuestro caso, los lentivirus recombinantes se utilizarían como sistema de liberación del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en las células tumorales para su evaluación como estrategia de quimiosensibilización.

De forma global, para conseguir lentivirus recombinantes teníamos que insertar el gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en un plásmido adecuado que permita transferir el genoma del lentivirus a las células hospedadoras. Posteriormente, el plásmido se transfectaría en estas células junto con los plásmidos que codificaban para las proteínas estructurales virales y las células transfectadas se encargarían de producir partículas retrovirales recombinantes y defectivas, que, posteriormente, serían purificadas y concentradas a partir de los sobrenadantes del cultivo celular.

4.2.6.1. GENERACIÓN DE LENTIVIRUS RECOMBINANTES prMRP2-OATP1B1 POR CLONACIÓN GATEWAY

El primer paso fue insertar el gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en el plásmido lentiviral genómico (pWPI), de manera que el gen de interés quedara flanqueado por sitios LTR y por la señal de empaquetamiento, además de otras secuencias necesarias en *cis* como el *primer binding site* y el tracto polipurínico necesario para la síntesis de la segunda cadena. Planteamos llevar a cabo la clonación por recombinación Gateway, por las numerosas ventajas que presenta frente a la clonación clásica, pero antes que eso hubo que realizar una serie de modificaciones del plásmido pWPI para adaptarlo tanto a la estrategia de quimiosensibilización basada en prMRP2-OATP1B1 como al procedimiento de clonación que se iba a utilizar.

Modificaciones genéticas del plásmido pWPI por clonación clásica

En primer lugar, pensamos que era necesario eliminar la secuencia del promotor del factor de elongación humano 1 α (prEF1a) del plásmido pWPI, ya que por el hecho de ser un promotor constitutivo, podría enmascarar la actividad de regulación del prMRP2 sobre OATP1B1. Para conseguir este propósito se llevó a cabo una PCR de alta fidelidad usando unos cebadores que permitieron amplificar el plásmido en su totalidad, salvo la secuencia del promotor. Tras la visualización y purificación del

amplicón del tamaño esperado, sus extremos 5' se fosforilaron y se desencadenó la ligación de sus extremos romos, obteniéndose el plásmido que denominamos pWPI-pL, carente del prEF1a (Figura 28).

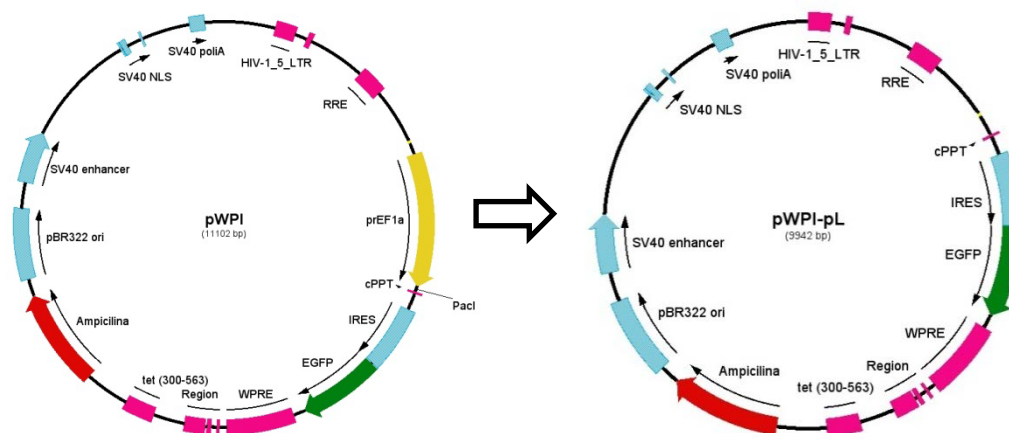


Figura 28. Representación esquemática del plásmido retroviral genómico (pWPI) y del plásmido pWPI-pL obtenido tras la eliminación de la secuencia del prEF1a por clonación clásica. En color verde se indica la secuencia codificante del gen *reporter* proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) precedida de una secuencia IRES, en rojo el gen de resistencia a ampicilina y en magenta las secuencias necesarias para el procesamiento del genoma viral.

La segunda modificación del plásmido que nos propusimos consistía en la conversión del pWPI-pL en un vector de destino Gateway mediante la incorporación en su esqueleto de un *cassette* típico de este tipo de vectores, constituido por las secuencias de un gen de resistencia a cloranfenicol y del gen *ccdB* flanqueadas por los sitios adaptadores *att*. Se amplificó por PCR de alta fidelidad la secuencia correspondiente al *cassette* de un vector de destino típico y se clonó en el único sitio de restricción disponible (*PacI*) para clonación clásica en el vector pWPI-pL. Siguiendo la metodología de la clonación clásica se obtuvo el vector de destino denominado pWPI-DEST (esquema no mostrado), adecuado para clonar la quimera de interés por recombinación Gateway.

Clonación del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en pWPI por recombinación Gateway y producción de lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1

Una vez construido el pWPI-DEST, éste se recombinó con un vector pEntry que contenía la secuencia Z3-prMRP2 y otro pEntry portador de la secuencia codificante de OATP1B1 mediante una reacción LR Multisite, a partir de la cual se obtuvo el plásmido retroviral genómico en el que se había insertado la secuencia del

gen quimérico prMRP2-OATP1B1 y al que denominamos pWPI-Z3-prMRP2-OATP1B1 (datos no mostrados).

Para la producción de lentivirus recombinantes, los plásmidos pWPI-Z3-prMRP2-OATP1B1 junto con los plásmidos empaquetadores psPAX2 y pMD2.G se transfectaron en las células hospedadoras HEK-293T. La observación de la fluorescencia de la EGFP permitió hacer un seguimiento del proceso, puesto que la secuencia de la EGFP estaba incorporada en el plásmido pWPI, pero no para producir una proteína de fusión sino una proteína independiente, al estar separada su secuencia de la del gen de interés por una región IRES (Figura 28).

Visualizamos la fluorescencia verde en las células empaquetadoras tras su transfección con los plásmidos citados, lo que indicaba que los plásmidos se habían incorporado eficazmente a estas células. Tras recoger el sobrenadante del cultivo que contenía las partículas virales y purificarlo, se infectaron células diana, en las que no detectamos fluorescencia (datos no mostrados). No pudimos elucidar si la ausencia de fluorescencia se debía a un bajo rendimiento en la producción de virus o a la obtención de partículas virales no funcionales. Pensamos que las secuencias *att* que flanqueaban el gen quimérico prMRP2-OATP1B1 que incorporamos en el plásmido genómico retroviral para llevar a cabo la recombinación Gateway, en la que se utilizan enzimas similares a las del fago λ , pudieran ser reconocidas por alguna de las enzimas codificadas por el genoma viral causando la pérdida de la expresión del transgén y el marcador EGFP.

4.2.6.2. GENERACIÓN DE LENTIVIRUS RECOMBINANTES prMRP2-OATP1B1 POR CLONACIÓN CLÁSICA

La falta de éxito en la transducción celular llevó a plantearnos una nueva estrategia de clonación clásica con enzimas de restricción para construir el plásmido lentiviral derivado del pWPI. El plásmido pWPI solo dispone de un sitio de restricción para clonar el gen de interés, así que decidimos modificarlo por mutagénesis dirigida para introducir nuevos sitios de restricción y poder llevar a cabo una clonación direccional. Se diseñaron cuatro *primers* sobre la secuencia del pWPI-pL que permitieran la amplificación del vector en dos fragmentos: uno de los dos cebadores que anillaban en el gen de resistencia a ampicilina introdujo un sitio de corte para *AhdI*, mientras que cada uno de los *primers* que no anillaban en el gen de resistencia a ampicilina incorporaba un sitio de restricción enzimática diferente, uno de ellos

reconocido por *Bpu1102I* y el otro por *SpeI*. Tras su amplificación por PCR, ambos amplicones fueron digeridos con *AhdI*, fosforilados y ligados para dar lugar a un plásmido que denominamos pWPI-pL-MCS (Figura 29).

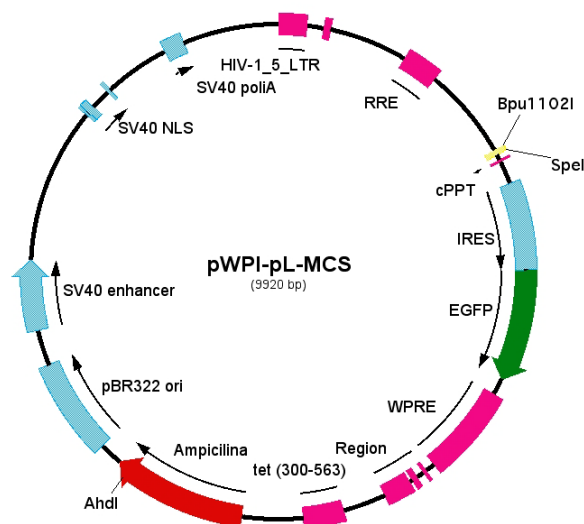


Figura 29. Representación esquemática del plásmido pWPI-pL-MCS obtenido por mutagénesis dirigida a partir del pWPI-pL, que incorporaba sitios de reconocimiento únicos para las enzimas de restricción *AhdI*, *Bpu1102I* y *SpeI*. En color verde se indica la secuencia codificante del gen *reporter* proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) precedida de una secuencia IRES, en rojo el gen de resistencia a ampicilina y en magenta las secuencias necesarias para el procesamiento del genoma viral.

Del mismo modo, se amplificó la secuencia del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 usando dos cebadores, cada uno de los cuales incorporaron cada una de las secuencias de reconocimiento de las dos enzimas de restricción citadas anteriormente, asegurándonos de esta manera direccionalidad en la clonación.

Tanto el plásmido modificado pWPI-pL-MCS como el amplicón obtenido tras la amplificación del gen quimérico prMRP2-OATP1B1, fueron digeridos por las enzimas de restricción *Bpu1102I* y *SpeI*. Ambos productos lineales se ligaron para finalmente obtener el plásmido retroviral genómico en el que se había insertado la secuencia del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 y al que denominamos pWPI-prMRP2-OATP1B1 (Figura 30). Se trata de un vector bicistrónico en el que los genes que codifican para OATP1B1 y EGFP forman parte de una misma unidad transcripcional que está regulada por el prMRP2.

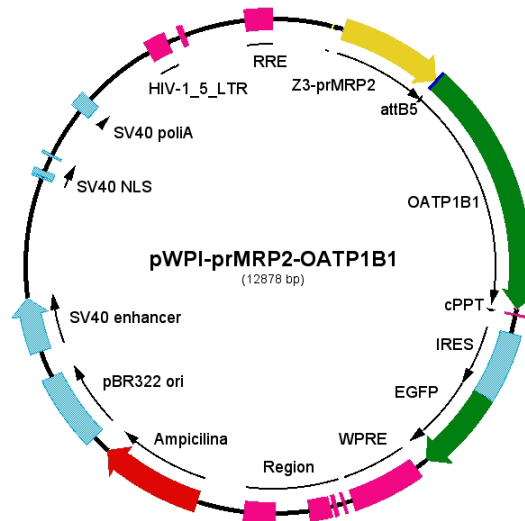


Figura 30. Representación esquemática del plásmido pWPI-prMRP2-OATP1B1 obtenido tras la inserción de la secuencia del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en el pWPI-pL-MCS por clonación clásica. En color verde se indican las secuencias codificantes de OATP1B1 y EGFP, separadas por una región IRES, que están reguladas por el prMRP2 señalado en amarillo, en rojo se muestra el gen de resistencia a ampicilina y en magenta las secuencias necesarias para el procesamiento del genoma viral.

Con este nuevo plásmido obtenido se generaron lentivirus recombinantes en la línea celular empaquetadora HEK-293T, donde posteriormente se titularon. Como se representa en la Figura 31, la expresión de la EGFP controlada por la actividad del prMRP2 fue confirmada a través de la visualización de su fluorescencia en células HEK-293T infectadas con lentivirus por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Se observó un pequeño desplazamiento del histograma correspondiente a las células infectadas con prMRP2-OATP1B1 como consecuencia de su mayor fluorescencia con respecto a las células silvestres no infectadas. Estos resultados sugieren que los virus eran válidos en la transducción del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en esas mismas células.

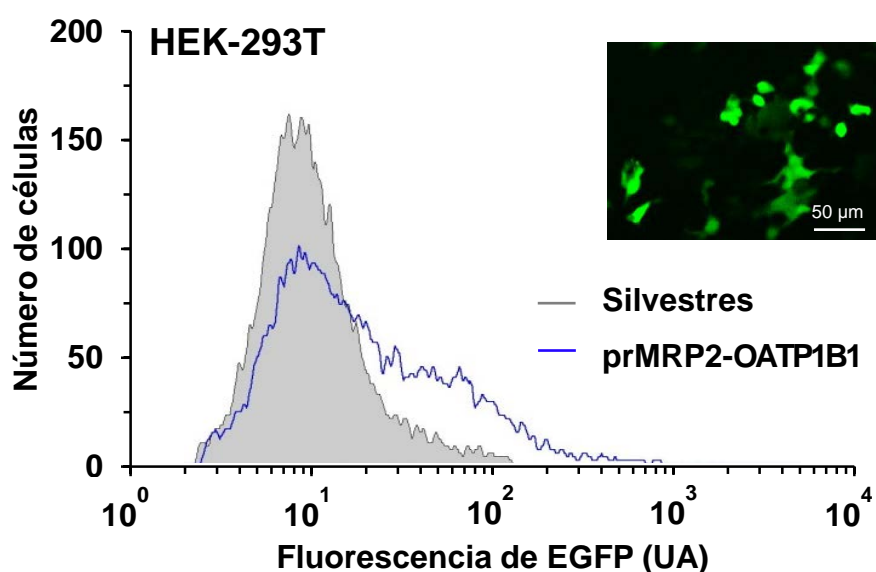


Figura 31. Histograma de frecuencia representativo de la fluorescencia de células HEK-293T infectadas con lentivirus recombinantes que contenían la quimera prMRP2-OATP1B1 y la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) y de células HEK-293T silvestres no infectadas. La fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo 4 días después de la transducción de las células con lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1 y se expresó en unidades arbitrarias (UA). El inserto muestra una fotografía representativa de las células HEK-293T infectadas con lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1 expresando EGFP, obtenida por microscopía de fluorescencia.

4.2.7. EXPRESIÓN ESTABLE DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER

Las células Alexander se infectaron con los virus recombinantes prMRP2-OATP1B1 y se analizó la fluorescencia de la población policlonal obtenida.

En la Figura 32A se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la fluorescencia por citometría de flujo. En ella se aprecia un desplazamiento del histograma de las células portadoras de prMRP2-OATP1B1 con respecto al de las células silvestres, debido a la fluorescencia de la EGFP regulada por la actividad del prMRP2. También se puede observar que la fluorescencia de las células que contienen prMRP2-OATP1B1 es 1000 veces inferior a la señal obtenida en las células infectadas con lentivirus pWPI, cuya expresión de EGFP está regulada por la acción del promotor del factor de elongación 1 α humano (prEF1a), caracterizado por dirigir una expresión constitutiva.

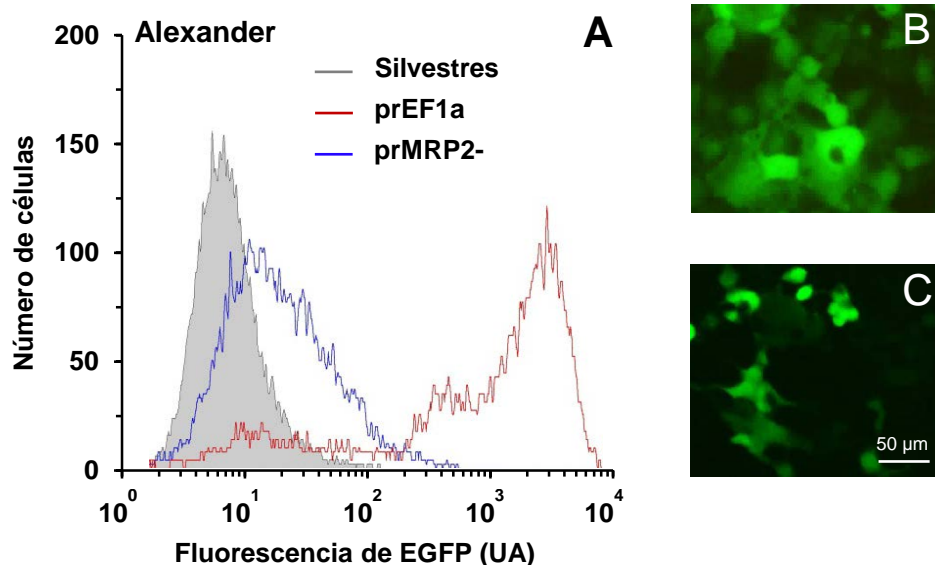


Figura 32. (A) Histograma de frecuencia representativo de la fluorescencia de células Alexander silvestres no infectadas y células infectadas con lentivirus que contenían la quimera prMRP2-OATP1B1 y la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) o la EGFP controlada por el promotor EF1a (prEF1a) usadas como control positivo. La fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo 4 días después de la transducción de las células con lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1, utilizando una MOI de 25 en presencia de polibreno, y se expresó en unidades arbitrarias (UA). (B y C) Fotografías representativas de células Alexander infectadas con lentivirus recombinantes pWPI (B) o prMRP2-OATP1B1 (C) que expresaban EGFP, obtenidas por microscopía de fluorescencia.

En paralelo al análisis anterior, se observaron al microscopio las células Alexander infectadas con lentivirus pWPI (Figura 32B) y células infectadas con lentivirus prMRP2-OATP1B1 (Figura 32C). En ambos casos se detectó fluorescencia debida a la expresión de EGFP, pero la intensidad fue menor en la población policlonal obtenida tras la infección con lentivirus prMRP2-OATP1B1; lo cual se corresponde con la diferencia de fluorescencia determinada en las células infectadas con lentivirus pWPI o con lentivirus prMRP2-OATP1B1.

La expresión del vector bicistrónico lentiviral pWPI-prMRP2-OATP1B1 dirigida por la actividad del prMRP2 en células Alexander está muy por debajo del nivel de expresión obtenido por un promotor constitutivo, como el prEF1a, en el vector pWPI en la misma línea celular. Cuando se había evaluado la actividad del prMRP2 en células Alexander usando *Luc2* como gen *reporter* (apartado 4.2.1.), se obtuvo un resultado de expresión comparable a la dirigida por el prCMV. Tanto el prCMV como el prEF1a se caracterizan por ser promotores constitutivos. Por tanto, la diferencia observada en la actividad del prMRP2 comparada con la de un promotor constitutivo, nos hace pensar

que el tipo de plásmido, bien por su tamaño o complejidad en cuanto a secuencias que incorpora en su esqueleto, pueda afectar a la actividad del promotor.

Encontramos gran variabilidad en la actividad de la quimera en las células infectadas, que probablemente se debía a que la inserción de la misma tras la infección viral puede ocurrir en diferentes zonas del genoma de la célula. Por ello nos planteamos llevar a cabo una selección clonal de las células Alexander transducidas con prMRP2-OATP1B1 para poder aislar aquellos clones que presentaran un nivel mayor de expresión de EGFP y, por tanto, un prMRP2 más activo. Utilizando el método de dilución límite se obtuvieron células aisladas en pocillos separados que, tras dejarlas proliferar, dieron lugar a diferentes clones, en los que se determinó por citometría de flujo el nivel de fluorescencia debida a la expresión de EGFP.

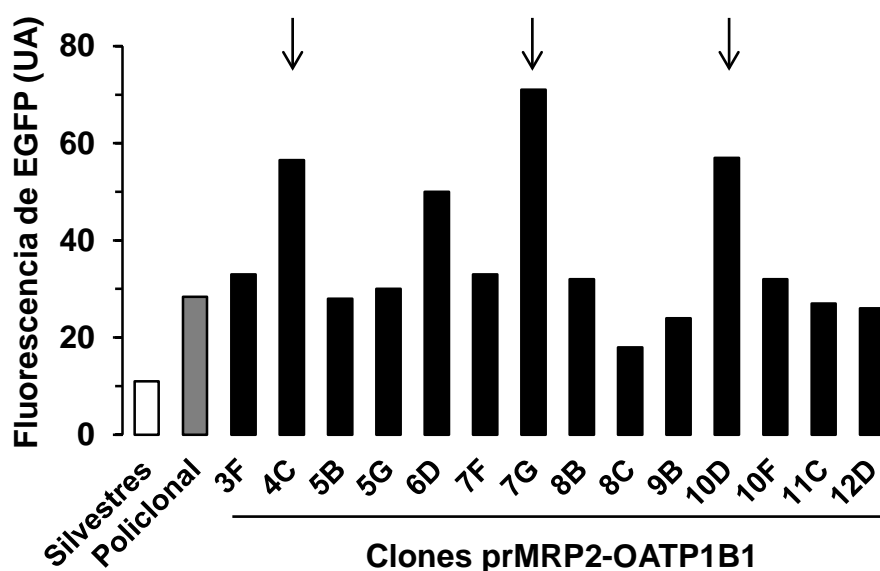


Figura 33. Fluorescencia de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) de diferentes clones de células Alexander aislados a partir de células policlonales infectadas con lentivirus que contenían la quimera prMRP2-OATP1B1 y la secuencia codificante de EGFP. Los valores representan la fluorescencia media expresada en unidades arbitrarias (UA) determinada por citometría de flujo de diferentes clones de células Alexander, de una población policlonal y de células silvestres no infectadas. Las flechas indican los clones que se seleccionaron para estudios posteriores.

Como aparece representado en la Figura 33, la población policlonal mostró un nivel de fluorescencia 3 veces superior a las células silvestres. Sin embargo, el valor de fluorescencia de la mayoría de los clones aislados no fue superior al de la población policlonal, salvo en el caso de las poblaciones monoclonales 4C, 6D, 7G y 10D. Seleccionamos los clones 4C, 7G y 10D por mostrar una mayor actividad del prMRP2,

reflejada en un valor de fluorescencia aproximadamente 2 veces superior al de las células Alexander policlonales.

4.2.8. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA ESTABLE

Para evaluar la funcionalidad de la quimera prMRP2-OATP1B1 en células transfectadas de forma estable usando un vector viral, en una primera aproximación, quisimos determinar el grado de inducción del prMRP2 por dexametasona en los distintos clones que habíamos seleccionado. Se analizó de nuevo por citometría de flujo la fluorescencia de las poblaciones monoclonales 4C, 7G y 10D debida a la expresión de EGFP tras su incubación con dexametasona.

Como se muestra en la Figura 34, cuando las células se trataban con dexametasona no se encontraron cambios en el nivel de fluorescencia en el caso de las células silvestres, mientras que sí se observó un incremento de la fluorescencia en las tres poblaciones monoclonales 4C, 7G y 10D, lo que demuestra la capacidad de respuesta del prMRP2 al inductor en el caso del nuevo método de transfección estable empleado. Basándonos en los valores de fluorescencia encontrados para cada una de las poblaciones monoclonales, seleccionamos el clon 4C por ser el que mayor grado de inducción experimentó por la acción de la dexametasona de manera cuantitativa, aunque el comportamiento observado en los tres clones celulares fue similar.

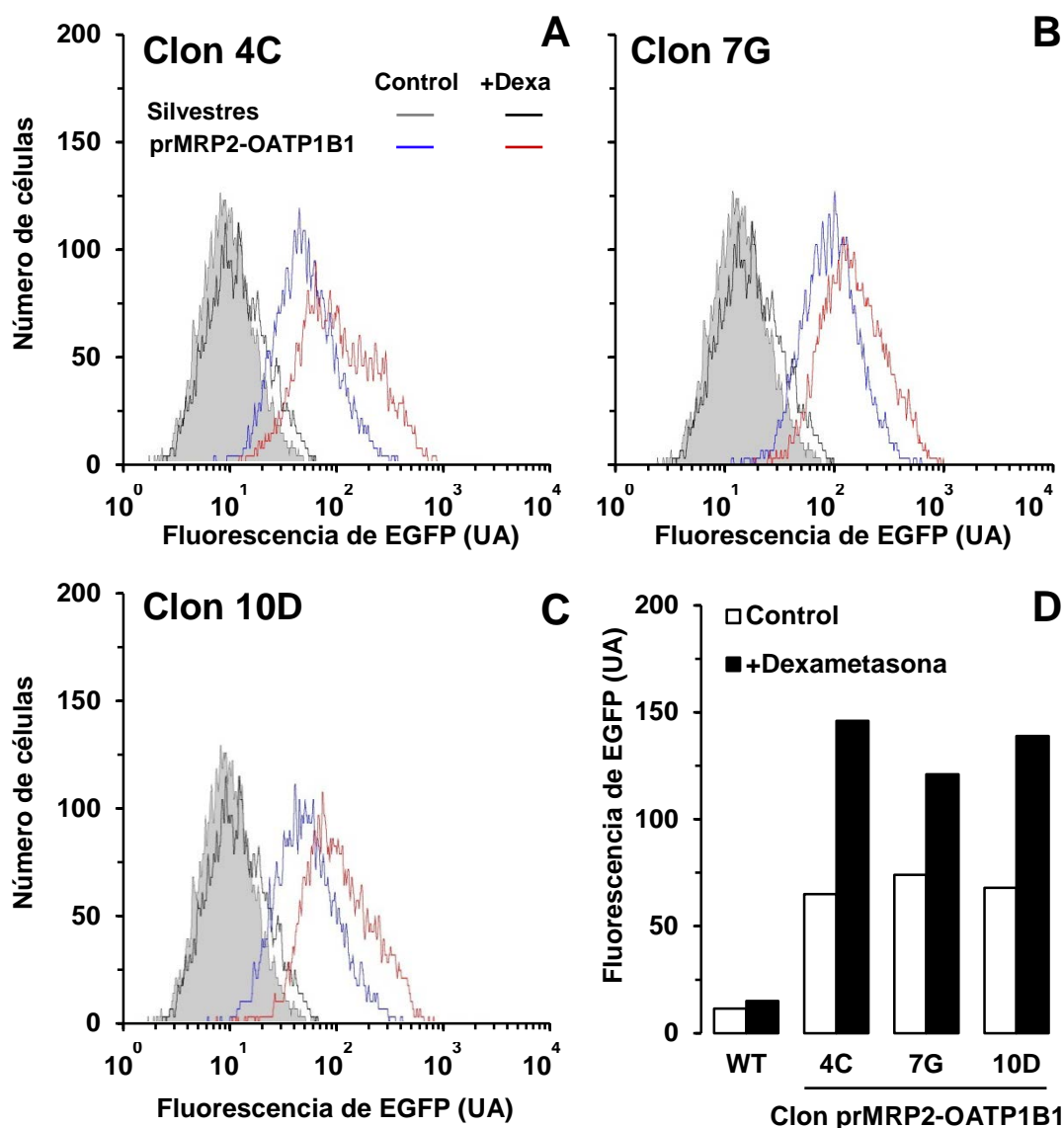


Figura 34. (A-C) Histogramas de frecuencia representativos de la fluorescencia de los clones de células Alexander 4C (A), 7G (B) y 10D (C) que expresaban OATP1B1 y la secuencia codificante de EGFP bajo el control del prMRP2 y de células silvestres, tratadas o no con dexametasona (Dexa). El análisis de la fluorescencia por citometría de flujo se llevó a cabo 24 h después del tratamiento de las células con 100 nM de dexametasona o con el solvente DMSO (Control). (D) Fluorescencia media, expresada en unidades arbitrarias (UA), de células Alexander silvestres y los diferentes clones de células infectadas con lentivirus que contenían la quimera prMRP2-OATP1B1, tratadas con dexametasona o con el vehículo (DMSO).

Seguidamente, llevamos a cabo ensayos citostáticos con la población monoclonal 4C, para evaluar su efecto de quimiosensibilización tras el tratamiento durante 72 h con diferentes fármacos antitumorales como el cisplatino y dos sustratos de la proteína de captación OATP1B1, el Bamet-UD2 y el paclitaxel.

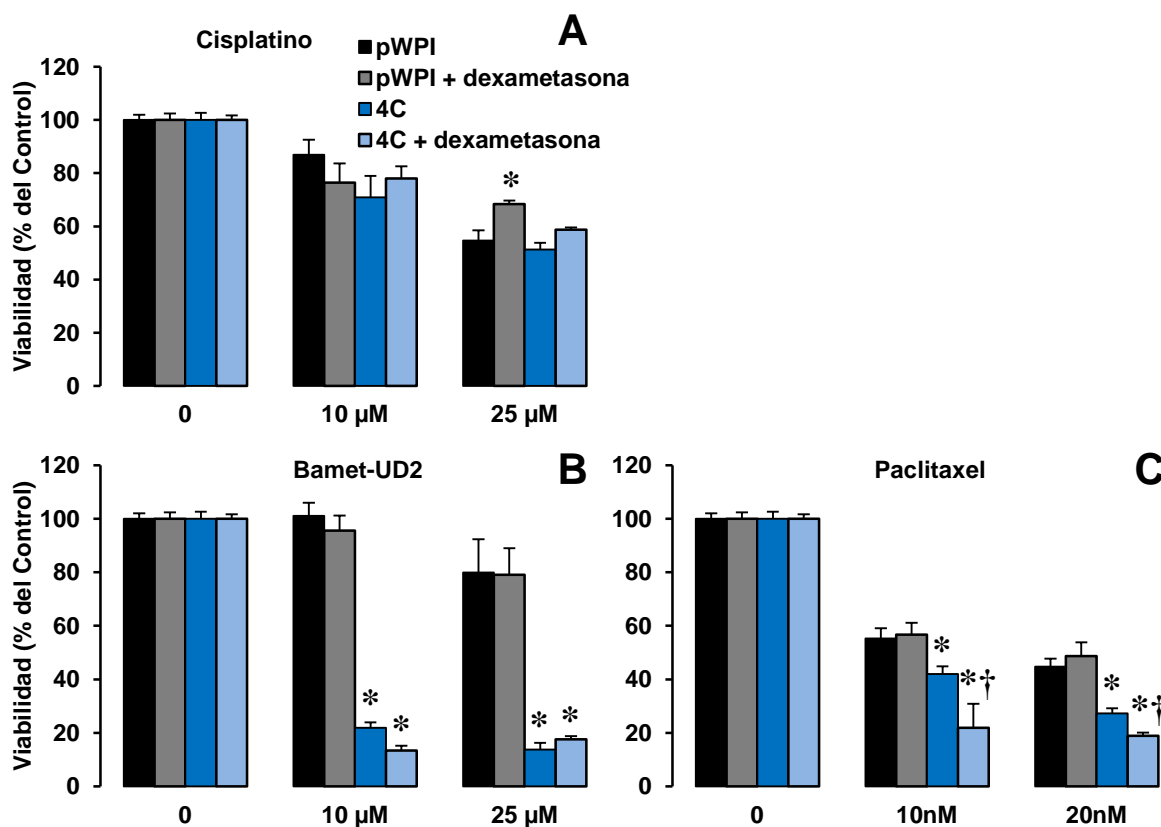


Figura 35. Efecto citostático del cisplatino (A), del Bamet-UD2 (B) y del paclitaxel (C) en células Alexander que expresaban de forma estable prMRP2-OATP1B1. Las células transducidas con lentivirus pWPI o lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1 fueron expuestas a los distintos fármacos antitumorales (cisplatino, Bamet-UD2 y paclitaxel), con o sin 100 nM de dexametasona, durante 72 h. Los valores se expresan en porcentaje del Control (100%) y son media \pm SD de al menos 3 experimentos realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con pWPI. †, $p < 0,05$, comparado con el mismo tipo de células no tratadas con dexametasona por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Los resultados obtenidos que aparecen representados en la Figura 35, fueron los esperados teniendo en cuenta que el cisplatino no es transportado por OATP1B1 y el Bamet-UD2 y el paclitaxel sí. Fueron similares a los obtenidos con células Alexander transfectadas de forma transitoria con prMRP2-OATP1B1 (Figura 24). La diferencia radicó en el mayor efecto quimiosensibilizante observado tras la exposición a Bamet-UD2 en el caso de las células que expresaban de forma estable prMRP2-OATP1B1, en comparación con las que lo expresaban transitoriamente (Figuras 35B y 24B). La pérdida de la viabilidad celular fue tan acusada que no pudo ser incrementada por la acción de la dexametasona (Figura 35B). En el caso del paclitaxel, el efecto de la quimera derivado de una expresión estable de la misma fue similar al derivado de la expresión de forma transitoria (Figuras 35D y 24B). Aunque los efectos fueron menores comparados con los del Bamet-UD2, se consiguió un efecto quimiosensibilizante en el

caso de las células que expresaban de forma estable prMRP2-OATP1B1, incrementándose por la acción de la dexametasona (Figura 35D).

4.2.9. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prMRP2-OATP1B1 EXPRESADO DE FORMA ESTABLE EN CÉLULAS QUIMIORRESISTENTES

Como se describió en el apartado 4.2.5, mediante transfección transitoria del plásmido pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 no se detectó la proteína OATP1B1 en las células LS174T/R. Como alternativa para poder evaluar la funcionalidad de prMRP2-OATP1B1 en células que habían desarrollado quimiorresistencia, a partir del mecanismo basado en la sobreexpresión MRP2 como consecuencia de la exposición prolongada a cisplatino, se infectaron células LS174T silvestres y LS174T/R con lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1.

Las poblaciones policlonales obtenidas para cada línea celular se analizaron por citometría de flujo para determinar su fluorescencia debida a la EGFP incorporada en el plásmido retroviral genómico y cuya expresión estaba gobernada por el prMRP2. Se observó un desplazamiento de los histogramas de fluorescencia en las células portadoras de prMRP2-OATP1B1 con respecto a las no infectadas, aunque de poca magnitud (Figura 36). Sin embargo, la medida de la fluorescencia puso de manifiesto una señal fluorescente mayor en las LS174T/R infectadas que en las LS174T silvestres infectadas, lo que sugería la existencia de una mayor actividad del prMRP2 en las células tumorales resistentes con respecto a las silvestres.

Por otra parte, se analizó el efecto inductor de la dexametasona sobre la EGFP que está regulada por el prMRP2 (Figura 36). No se apreciaron cambios de fluorescencia en las células no infectadas tratadas con dexametasona en comparación con las no tratadas, mientras que tanto en las LS174T silvestres y LS174T/R infectadas con lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1 sí se observó un incremento de fluorescencia de aproximadamente el doble con respecto a sus respectivos controles. Los resultados sugieren que tanto en células LS174T silvestres como resistentes el prMRP2 es inducible.

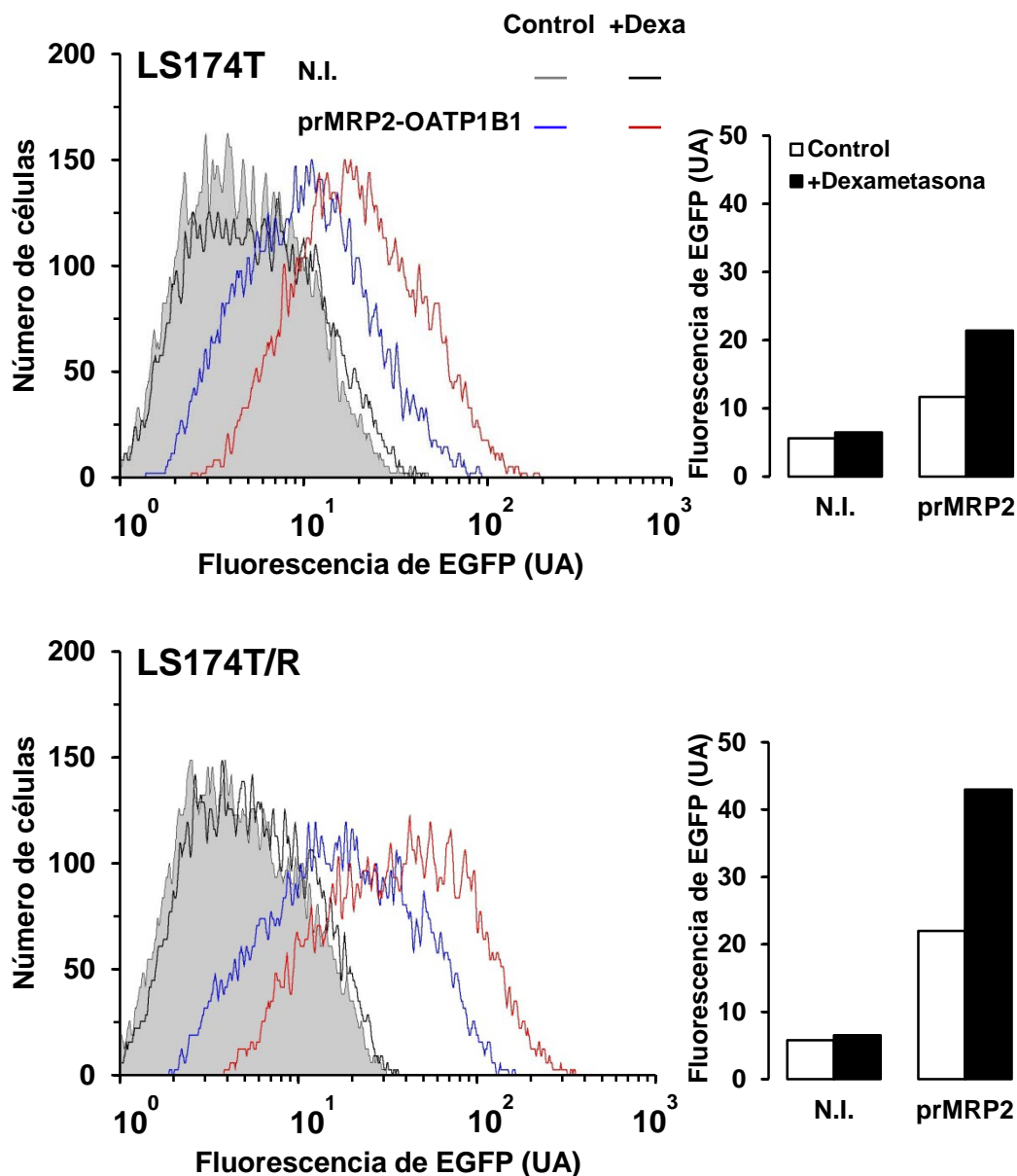


Figura 36. Histograma de frecuencia representativo de la fluorescencia de células LS174T silvestres (LS174T) y LS174T/R no infectadas (N.I.) e infectadas con lentivirus que contenían la quimera prMRP2-OATP1B1 y la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), tratadas o no con dexametasona (Dexa). El análisis de la fluorescencia por citometría de flujo se llevó a cabo 24 h después del tratamiento de las células con 100 nM de dexametasona o con el solvente DMSO (Control). En los histogramas de barras situados a la derecha se representa la fluorescencia media, expresada en unidades arbitrarias (UA), de los distintos grupos y condiciones experimentales.

La evaluación de la quimera prMRP2-OATP1B1 como estrategia de quimiosensibilización en células resistentes a la quimioterapia se llevó a cabo sobre las poblaciones de células LS174T silvestres y LS174T/R policlonales infectadas con lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1 o con lentivirus pWPI usadas como control.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para células Alexander infectadas con los mismos lentivirus y se usaron los mismos fármacos antineoplásicos (apartado 4.2.8.).

En el caso del cisplatino, se encontró mayor viabilidad en las células LS174T/R con respecto a las LS174T silvestres en la condición de tratamiento con 5 μM de cisplatino, precisamente por su característica resistencia adquirida a este fármaco; esa diferencia fue menos evidente a una concentración alta del citostático, 25 μM (Figura 37A y B). El tratamiento con cisplatino no implicó cambios de viabilidad celular entre los distintos grupos experimentales de cada población celular para cada concentración del fármaco ensayada, incluso en las tratadas con dexametasona. Los resultados obtenidos para el cisplatino fueron los esperados, teniendo en cuenta que este fármaco no es sustrato de OATP1B1.

Por el contrario, el tratamiento de las células LS174T silvestres con Bamet-UD2 y paclitaxel, ambos sustratos de OATP1B1, produjo una pérdida de la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis que afectó por igual a los distintos grupos experimentales, independientemente del vector viral con el que fueron transducidas las células y de que hubiesen recibido tratamiento con dexametasona. Sin embargo, sí se apreciaron cambios en la viabilidad celular en el caso de las células LS174T/R. El tratamiento con Bamet-UD2 y paclitaxel, causó una disminución significativa de la viabilidad de las células portadoras de prMRP2-OATP1B1 con respecto a las células transducidas con el vector vacío pWPI. Ese descenso de la viabilidad celular se incrementó aún más por el efecto de la dexametasona en todas las condiciones ensayadas de Bamet-UD2 y paclitaxel. No se observaron cambios significativos durante el tratamiento con dexametasona de las células transducidas con el vector pWPI para las diferentes condiciones experimentales.

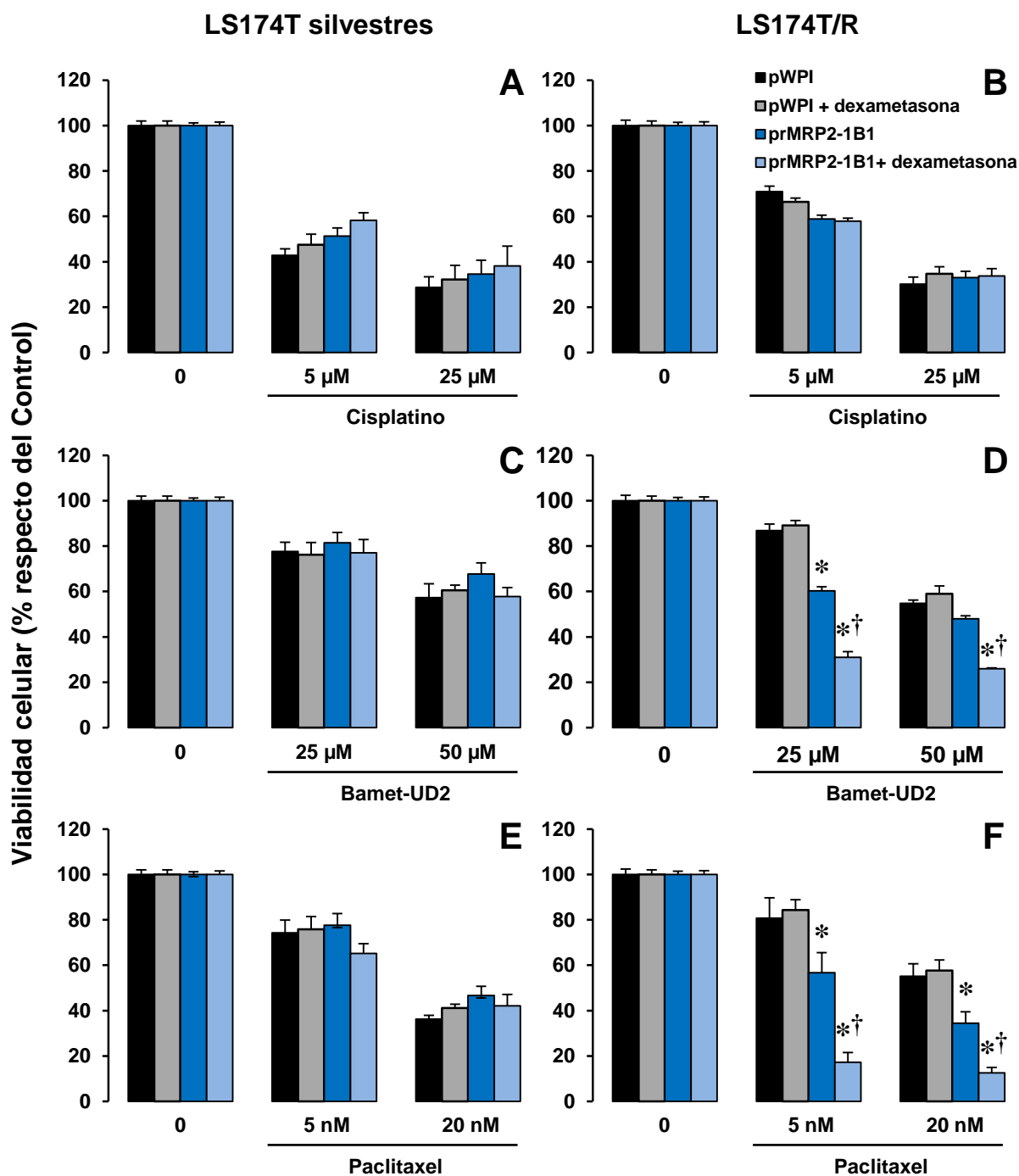


Figura 37. Efecto citostático del cisplatino (A, B), del Bamet-UD2 (C, D) y del paclitaxel (E, F) en células LS174T silvestres y LS174T/R que expresaban de forma estable prMRP2-OATP1B1. Las células transducidas con lentivirus pWPI o lentivirus recombinantes prMRP2-OATP1B1 fueron expuestas a los distintos fármacos antitumorales (cisplatino, Bamet-UD2 y paclitaxel), con o sin 100 nM de dexametasona, durante 72 h. Los valores se expresan en porcentaje del Control (100%) son media \pm SD de 3 experimentos realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con pWPI. †, $p < 0,05$, comparando el mismo tipo de células no tratadas con dexametasona por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto de forma clara el efecto quimiosensibilizante del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en células tumorales que han desarrollado resistencia a través del mecanismo de sobreexpresión de MRP2. El propio mecanismo de quimiorresistencia favorece la estimulación del gen quimérico y, por tanto, la expresión de OATP1B1, encargada de la captación del Bemet-UD2 y del paclitaxel que ejercen un mayor efecto citostático sobre esas células comparado con las infectadas con el vector pWPI. En el caso de la población policlonal LS174T silvestres no se observó ningún efecto de estimulación del gen prMRP2-OATP1B1 probablemente porque la expresión de MRP2 en este tipo celular es muy baja.

La dexametasona incluida en el tratamiento de las células LS174T/R portadoras de prMRP2-OATP1B1 con Bemet-UD2 y paclitaxel, acentúa aún más el efecto del gen quimérico llegando a conseguirse niveles de viabilidad de las células tumorales muy bajos, sobretodo en el caso del paclitaxel. La inducción de la actividad del prMRP2 no se vio reflejado en una pérdida de la viabilidad de las células silvestres que contenían el gen quimérico prMRP2-OATP1B1, pero dicho efecto sí se había confirmado de forma previa en la cuantificación de la EGFP regulada por el prMRP2 por citometría de flujo (Figura 36), gracias a la sensibilidad del instrumento puesto que los niveles de fluorescencia obtenidos eran muy bajos. Es probable que el efecto inductor de la dexametasona sobre un nivel de expresión basal de MRP2 bajo, no sea suficiente como para verse reflejado en una pérdida de la viabilidad celular en este tipo de células.

Por otra parte, cabe destacar que en algunas condiciones experimentales, como es el caso del tratamiento con paclitaxel combinado con dexametasona, apenas se distinguen diferencias en los resultados de viabilidad celular obtenidos para las dos dosis del fármaco ensayadas y la elección de una concentración menor de paclitaxel supondría ventajas desde el punto de vista de la toxicidad e inespecificidad celular de este tratamiento quimioterapéutico, que se aplicaría como un tratamiento sistémico que, en principio, afectaría por igual a células sanas y tumorales. En ese sentido, el Bemet-UD2 por ser un fármaco vectorizado, dirigido al hígado, tendría ventajas sobre el paclitaxel en el tratamiento del HCC.

DISCUSIÓN GLOBAL

Hemos desarrollado una estrategia de terapia génica basada en la introducción del gen quimérico prMRP2-OATP1B1 en células tumorales.

Los resultados obtenidos en las diferentes líneas tumorales utilizadas sugieren que el propio patrón de expresión génica de cada tipo celular gobierna el efecto quimiosensibilizante de la estrategia evaluada y que el efecto antiproliferativo derivado de la misma sólo se pondrá de manifiesto en células en las que el prMRP2 es activo transcripcionalmente, como las Alexander, o en células tumorales como las LS174T/R que han desarrollado resistencia por la sobreexpresión de MRP2, mientras que las células con baja expresión de esta proteína no experimentarán el efecto citostático derivado de la quimera prMRP2-OATP1B1. En vistas a su aplicación clínica, esto se traduciría en que, aunque la incorporación del gen quimérico tras la administración sistémica del tratamiento de terapia génica ocurra en cualquier tejido del organismo, el efecto quimiosensibilizante de prMRP2-OATP1B1 durante el tratamiento farmacológico resultaría específico sobre tejidos o tumores caracterizados por una expresión alta de MRP2 y no afectaría a tejidos sanos donde no se expresa MRP2. Se plantea como un tratamiento de terapia génica del HCC por considerarse uno de los tipos de tumores que mayor resistencia presentan a la quimioterapia debida, entre otros mecanismos, a la sobreexpresión de MRP2.

Hasta el momento se han desarrollado diferentes estrategias dirigidas a revertir la quimiorresistencia a distintos fármacos citotóxicos mediada por la sobreexpresión de MRP2, como ya se comentó al comienzo de este bloque de Resultados y Discusión. En los últimos años, las más comunes han sido aquellas basadas en la inhibición de la MRP2 a través del uso de oligonucleótidos antisentido (Folmer, 2007), ARN de interferencia y ribozimas (Kowalski, 2005) dirigidos a MRP2. La inhibición de MRP2 a partir de tratamientos no vectorizados, puede tener repercusiones fisiológicas en tejidos sanos que la expresan y, por ello, hay que tomar precauciones a la hora de aplicar este tipo de tratamientos. Nuestra estrategia de terapia génica basada en la actividad del prMRP2 no tiene como objetivo inhibir o modificar la proteína endógena, sino que simplemente se aprovecha de la situación o circunstancias de la resistencia tumoral intrínseca o adquirida por sobreexpresión de MRP2 para llevar a cabo su mecanismo de acción.

El tratamiento de quimioterapia combinado con dexametasona incrementaría su efecto antiproliferativo sobre las células tumorales. Su efecto inductor temporal sobre

células sanas con una expresión baja de MRP2 que contengan el gen quimérico no se traduciría en pérdida de la viabilidad celular, como ocurre en las LS174T silvestres. Por otra parte, la dexametasona permitiría incrementar el efecto terapéutico de la quimioterapia sin tener que administrar para ello dosis mayores de los fármacos antitumorales, lo que reduciría sus efectos secundarios adversos derivados de la toxicidad e inespecificidad sobre las células.

La quimioterapia aplicada junto a la estrategia quimiosensibilizante planteada estaría restringida al uso de sustratos de OATP1B1, tales como el paclitaxel o los Bimet, pero no a fármacos incluidos en los tratamientos convencionales habituales, como la doxorubicina, el cisplatino y el sorafenib, entre otros.

4.3. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR BASADA EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE BIRC5 Y LA PROTEÍNA DE CAPTACIÓN DE FÁRMACOS OATP1B3

Siguiendo la línea de los antecedentes planteados en el apartado 4.2, además de la sobreexpresión de MRP2, otro de los mecanismos implicados en la aparición de resistencia al tratamiento farmacológico en el HCC es el aumento de expresión de la proteína antiapoptótica survivina, codificada por el gen *BIRC5*, que está englobado en el MOC-5b (Marin, 2010).

La survivina es un miembro de la familia de inhibidores de apoptosis (IAP) encargada de la regulación de dos procesos celulares esenciales: la inhibición de la apoptosis y la potenciación de la proliferación celular. Su función antiapoptótica la ejerce actuando sobre mediadores de la apoptosis pertenecientes tanto a la vía extrínseca como intrínseca, mientras que su papel en la proliferación celular lo lleva a cabo formando parte del complejo cromosómico pasajero (CPC). Normalmente, en tejidos diferenciados sanos, los niveles de expresión de *BIRC5* son nulos o muy bajos, mientras que este gen se encuentra altamente expresado en muchos tumores.

Basándose en esta expresión diferencial, la survivina ha sido propuesta como una diana para el desarrollo de terapias antitumorales (Ryan, 2009). Dicha especificidad unida al hecho de que su expresión esté regulada a nivel transcripcional, han despertado un gran interés en el desarrollo de diferentes estrategias de terapia génica dirigidas transcripcionalmente, basadas en la activación del promotor de la survivina de manera específica en tumores (Chen, 2004; Qu, 2013).

En un trabajo llevado a cabo en nuestro grupo se encontró que una de las características comunes al patrón de expresión génica de diferentes tumores hepáticos como el HCC, el hepatoblastoma y el CGC es el aumento de expresión de la survivina (Martinez-Becerra, 2012). Estos tumores también presentan una expresión disminuida de las proteínas de captación OCT1 y OATP1B1 (Martinez-Becerra, 2012) y, aunque en este trabajo solo se encontraron cambios significativos en la expresión de OATP1B3 en CGC, en otros estudios se describió que en el HCC también se reduce la expresión del OATP1B3 (Vavricka, 2004).

En el mismo sentido que la estrategia de terapia génica quimiosensibilizante propuesta en el caso de la quimera prMRP2-OATP1B1, planteamos el desarrollo en este

caso de una estrategia terapéutica más específica del tejido tumoral que la citada anteriormente, e igualmente dirigida al tratamiento de tumores hepáticos, basada en la clonación de un gen quimérico que contenga la secuencia codificante de una proteína de captación de fármacos citostáticos, como OATP1B3, bajo el control del promotor del gen *BIRC5*, implicado en quimiorresistencia. Cabe destacar que el transportador OATP1B3 es mejor transportador de fármacos antineoplásicos que OATP1B1, encontrándose entre sus sustratos el sorafenib, el metotrexato, la actinomicina D, las camptotecinas como el irinotecán y el SN-38, los taxanos como el paclitaxel y el docetaxel, y la mitoxantrona (Yamaguchi, 2008; Zimmerman, 2013). La vectorización de estos compuestos hacia tejidos hepáticos se vería incrementada si se conjugan con ácidos biliares como es el caso del cisplatino en los Bameet, que son reconocidos como sustratos por el OATP1B3.

4.3.1. CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE BIRC5

En base a nuestra experiencia previa, descrita en el apartado anterior, decidimos evaluar la utilidad de la estrategia farmacológica basada en el gen quimérico prBIRC5-OATP1B3 utilizando la metodología experimental que había resultado más eficaz para demostrar la funcionalidad de la quimera prMRP2-OATP1B1; es decir, el uso de lentivirus para obtener células que lo integren en su genoma y no lo incorporen de manera temporal. Por lo tanto, diseñamos un procedimiento de clonación para producir lentivirus recombinantes como sistemas de liberación del gen de interés y obtener células establemente transfectadas con la quimera.

El primer paso fue la amplificación por PCR analítica de una región de 1468 pb del gen *BIRC5* localizada en dirección 3'-5' del codón de inicio del gen y que consideramos como zona promotora del *BIRC5* (prBIRC5). Utilizamos como molde ADN genómico de las líneas celulares Alexander, de hepatoma humano, y Sk-Hep1, de HCC. Los amplicones obtenidos fueron del tamaño esperado y se analizaron primero por estudios de restricción y después por secuenciación para comprobar su identidad respecto a la secuencia publicada en la base de datos GenBank (U75285). Las secuencias amplificadas se correspondían con la del prBIRC5, aunque durante su análisis se identificaron diferentes mutaciones en ambas secuencias, que se indican en la Tabla 3. Todas las mutaciones encontradas estaban ya descritas y fueron polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), ya que su frecuencia alélica fue mayor del 1% en la población; salvo una inserción de 17 nucleótidos identificada en la posición -957 del prBIRC5 de células Alexander, que fue la única que no estaba descrita. En el

prBIRC5 de Alexander se identificaron 9 mutaciones, mientras que en el de las células Sk-Hep1, 5. Los SNP de las posiciones -31, -1245 y -1345 fueron comunes a las secuencias de ambas líneas celulares (Tabla 3).

Tabla 3. Nomenclatura y frecuencia alélica de las variantes genéticas encontradas de *BIRC5*.

| Posición (NT_010783) | Referencia SNP | MAF | Nucleótido (NM_001012270) | Línea celular |
|----------------------|----------------|-----------|---------------------------|---------------------|
| 76210367 | rs9904341 | C = 41,1% | c.-31G>C | Alexander / Sk-Hep1 |
| 76210163 | rs17887126 | A = 2,6% | c.-235G>A | Sk-Hep1 |
| 76209773 | rs8073069 | C = 30,5% | c.-625G>C | Alexander |
| 76209754 | rs8073903 | C = 37,0% | c.-644T>C | Alexander |
| 76209747 | rs75769819 | T = 1,8% | c.-651C>T | Alexander |
| 76209488 | rs78961505 | C = 1,8% | c.-910G>C | Alexander |
| 76209441 | Nuevo | | c.-957ins[17] | Alexander |
| 76209275 | rs12449899 | A = 16,6% | c.-1123G>A | Sk-Hep1 |
| 76209153 | rs3764381 | T = 28,3% | c.-1245C>T | Alexander / Sk-Hep1 |
| 76209053 | rs3764382 | G = 29,9% | c.-1345A>G | Alexander / Sk-Hep1 |
| 76208959 | rs144193557 | G = 1,8% | c.-1439C>G | Alexander |

La posición de los nucleótidos en el cromosoma y respecto al codón de inicio del *BIRC5* se basan en las secuencias NT_010783 y NM_001012270, respectivamente. MAF representa la frecuencia alélica del alelo menos común en la población. El número de referencia del SNP corresponde al de la base de datos NCBI.

Los resultados de RT-PCR cuantitativa obtenidos previamente en nuestro laboratorio revelaban una expresión del gen *BIRC5* en células Alexander 40 veces superior a la obtenida en hígado sano, mientras que en la línea celular Sk-Hep1 tan sólo aumentó 4 veces con respecto al mismo control. Estas diferencias en el nivel de expresión podrían deberse al conjunto de mutaciones presentes en la secuencia del prBIRC5 de ambas líneas celulares. Está descrito que ciertas mutaciones en prBIRC5 son responsables de su aumento de actividad en distintos tipos de cáncer (Kim, 2003). En base a los resultados obtenidos seleccionamos la variante del prBIRC5 clonado a partir del ADN genómico de células Alexander para continuar desarrollando nuestro trabajo.

El siguiente paso fue clonar el prBIRC5 en un vector donador de Gateway, el pDONR P1-P5, mediante una reacción BP. Se aislaron diferentes colonias

transformadas con el producto de reacción y el ADN plasmídico extraído en cada caso se secuenció. A partir de las secuencias analizadas discriminamos dos alelos diferentes del prBIRC5 con un genotipo idéntico, salvo en la posición -31.

El SNP localizado en la posición -31 del promotor del gen *BIRC5* forma parte del elemento represor CDE/CHR (elemento dependiente del ciclo celular y región de homología del ciclo celular). Se ha descrito que las modificaciones que ocurren en este motivo de unión a represor pueden conllevar un aumento de la transcripción del gen *BIRC5* en algunos tipos de cáncer (Xu, 2004). Por ejemplo, aún no se ha dilucidado si el SNP c.-31G>C supone un factor de riesgo de desarrollo de cáncer, pero la presencia de esta mutación se ha relacionado con la quimiorresistencia tumoral (Marin, 2012).

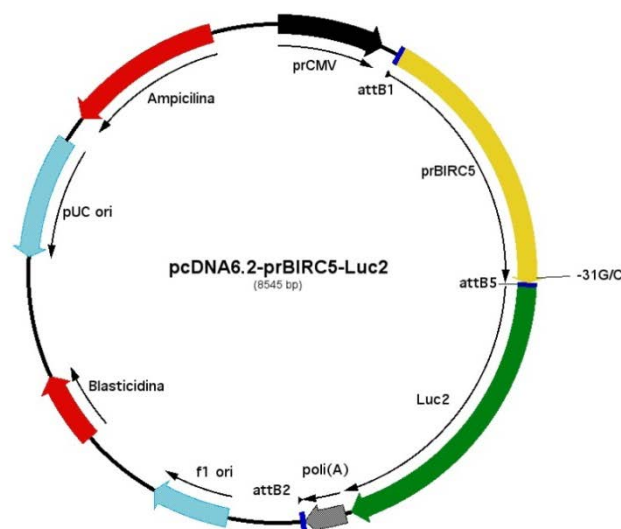


Figura 38. Esquema de los vectores de expresión obtenidos por clonación por recombinación Gateway, cada uno de los cuales contenía una variante prBIRC5 (silvestre (-31G) o mutada (-31C)) controlando la expresión de la secuencia codificante de la luciferasa (*Luc2*).

Con el fin de seleccionar uno de los alelos del prBIRC5 que habíamos obtenido, decidimos analizar la actividad de cada uno de ellos estudiando su efecto sobre la expresión génica del gen *reporter Luc2*. Para ello, fue necesario generar vectores de expresión prBIRC5-Luc2 a partir de los dos plásmidos pEntry que contenían las dos secuencias aisladas del prBIRC5. Cada uno de estos plásmidos pEntry se recombinó con otro pEntry que contenía la secuencia codificante de *Luc2* y el vector de destino pcDNA6.2-V5-pL-DEST mediante una reacción LR Multisite. Los esquemas de los vectores de expresión pExp-prBIRC5-Luc2 obtenidos se muestran en la Figura 38.

Puesto que los alelos aislados se clonaron a partir del ADN genómico de células Alexander, usamos este tipo celular para determinar la actividad de las dos variantes del prBIRC5. Se transfectaron células con cada uno de los vectores de expresión, con un plásmido usado como control positivo, en el que la secuencia codificante de *Luc2* estaba precedida por el prCMV o, como control negativo, con otro plásmido en el que *Luc2* no se encontraba controlada por promotor alguno.

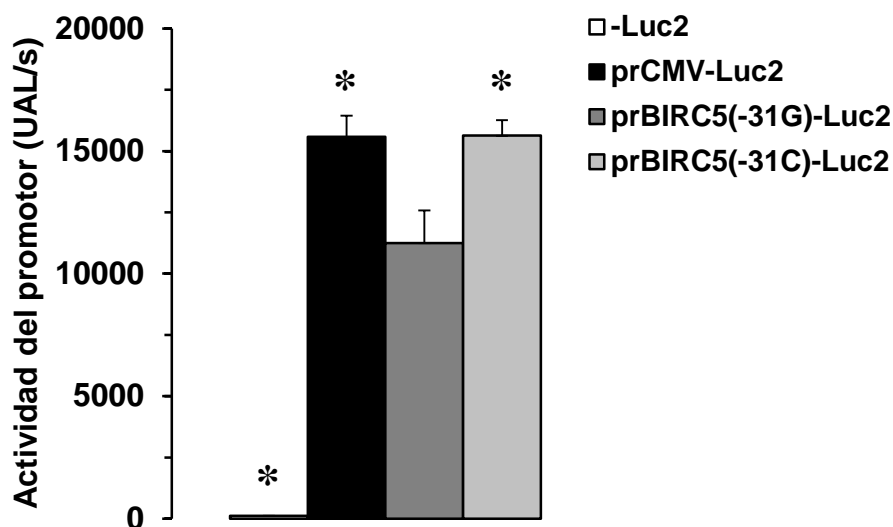


Figura 39. Actividad luciferasa no regulada por promotor y regulada por la actividad de diferentes promotores (prCMV, prBIRC5(-31G) y prBIRC5(-31C)) en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con los plásmidos correspondientes. A las 48 h después de la transfección se midió la actividad de la luciferasa. La señal de luminiscencia se expresó como unidades arbitrarias de luz (UAL)/s. Los valores representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con la variante silvestre de prBIRC5(-31G) por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 39, indicaban un nivel de luminiscencia prácticamente inapreciable en el caso de las células usadas como control negativo. Los otros tres grupos experimentales emitieron un nivel de luz muy elevado, observándose valores similares en los casos de las construcciones que contenían el prBIRC5 o el prCMV. En el caso de la variante mutada del prBIRC5 (-31C) se midió un nivel de luz significativamente mayor que la obtenida en el caso del prBIRC5 silvestre (-31G).

Estos resultados indican que la actividad del prBIRC5 es comparable a la de un promotor que dirige una expresión constitutiva, como el prCMV. Dado que la única diferencia existente entre los alelos del prBIRC5 incluidos en este análisis radica en el

nucleótido de la posición -31, la variante -31C sería la causante de una mayor actividad transcripcional del prBIRC5, como ya habían sugerido algunos autores (Xu, 2004).

En base a los resultados obtenidos, seleccionamos el alelo del prBIRC5 que contenía la variante mutada (-31C) para dirigir la expresión en la estrategia de terapia génica, cuyo desarrollo es objeto de este trabajo.

4.3.2. EXPRESIÓN DE OATP1B3 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA TRANSITORIA CON prBIRC5-OATP1B3

El siguiente paso fue la clonación de la proteína de captación OATP1B3. Su secuencia codificante se amplificó a partir de un plásmido que disponíamos en el laboratorio, que había sido clonado a partir de ARN de hígado humano. Mediante PCR de alta fidelidad, usando *primers* que incorporaban en sus extremos los sitios *attB5* y *attB2*, el amplicón resultante se clonó en el vector donador de Gateway, el pDONR221 P5-P2, dando lugar a un vector pEntry. La secuenciación de la ORF del OATP1B3 reveló la presencia de las mutaciones p.S112A y p.M233I. Se trata de mutaciones ya descritas, que son muy frecuentes, no alteran ni la expresión ni la localización de la proteína y tampoco afectan a su capacidad transportadora, incluso para ciertos sustratos la aumentan respecto a la variante silvestre (Letschert, 2004).

Antes de iniciar los experimentos de evaluación de la quimera prBIRC5-OATP1B3 como estrategia farmacológica, decidimos comprobar que a partir del gen quimérico clonado se expresaba OATP1B3 y que la localización celular de la proteína era en la membrana plasmática.

Para ello, construimos un plásmido que contenía el gen quimérico prBIRC5-OATP1B3 donde la proteína de captación se etiquetó con el epítipo V5 para seguir su expresión y localización subcelular. Se llevó a cabo una LR Multisite entre los plásmidos pEntry-prBIRC5(-31C) y pEntry-OATP1B3 y el vector de destino pcDNA6.2-V5-pL-DEST a partir de la cual se obtuvo el vector de expresión pcDNA6.2-prBIRC5-OATP1B3-V5 (Figura 40).

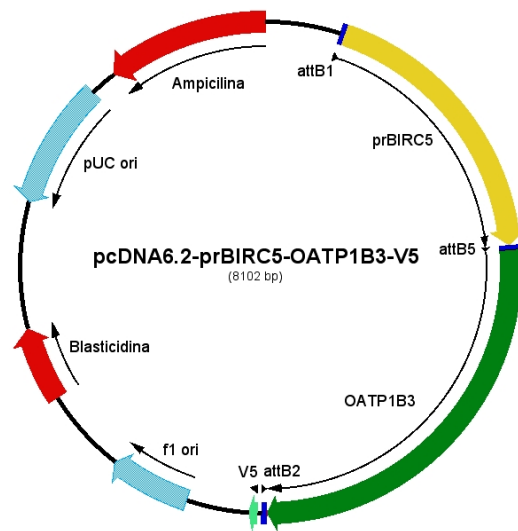


Figura 40. Esquema del vector de expresión obtenido por clonación por recombinación Gateway, que contenía la variante mutada del prBIRC5(-31C) controlando la expresión de la secuencia codificante de la proteína transportadora OATP1B3 y el epítipo V5. En color azul oscuro, flanqueando las secuencias citadas anteriormente, aparecen representadas las secuencias adaptadoras *att* que resultan necesarias en las recombinaciones durante la clonación del plásmido, en rojo los genes de resistencia a antibióticos y en azul claro los orígenes de replicación.

Se estudió la expresión del OATP1B3-V5 en células de hepatoma humano Alexander transfectadas de forma transitoria con el plásmido citado. A diferentes días desde la transfección y en paralelo, se obtuvieron lisados de células transfectadas para analizarlos por Western blot, al igual que se fijaron las células para llevar a cabo estudios de inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia reveló un marcaje específico, que no se observó en las células silvestres (Figura 41A), y que era más intenso en la membrana plasmática de las células que expresaban OATP1B3-V5, lo cual correspondía a una localización celular correcta del transportador (Figuras 41C y 41D).

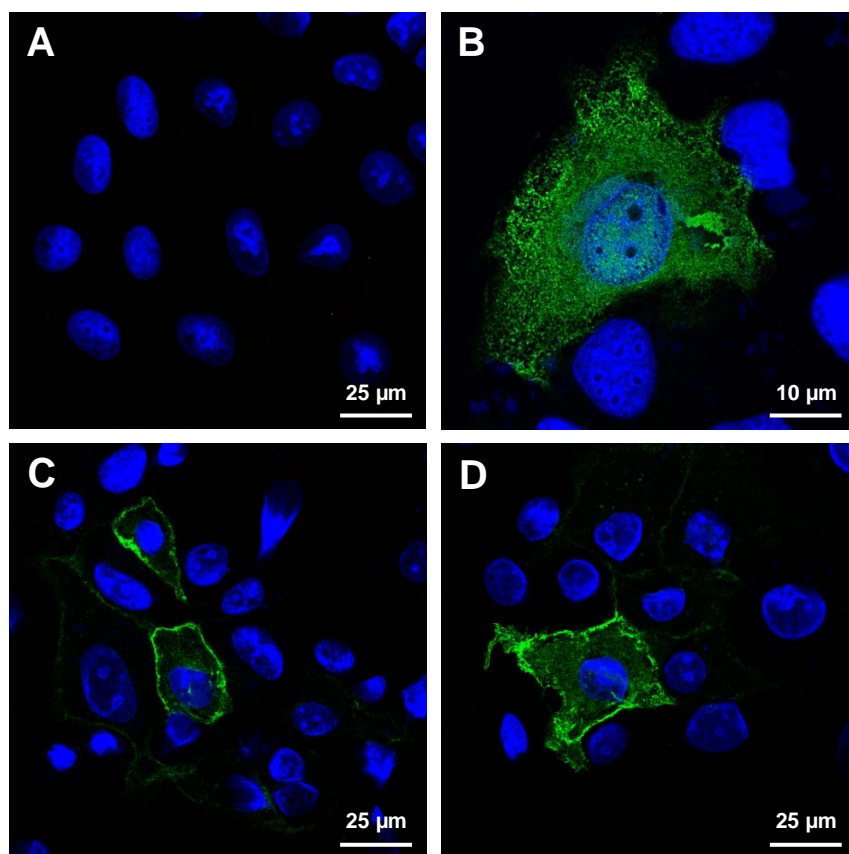


Figura 41. Localización por inmunofluorescencia de la proteína OATP1B3 etiquetada con V5 (en color verde) en células Alexander silvestres (A), células que expresaban cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)-V5 usadas como control positivo (B), y células transfectadas con pcDNA6.2-prMRP2-OATP1B1-V5 (C y D) a partir del día 2 después de la transfección. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (en color azul).

En base a los datos de los que disponíamos hasta el momento, esperábamos una expresión alta de OATP1B3 regulada por el prBIRC5, suficiente como para ser detectada a nivel de proteína. Como era de esperar, se detectó una expresión muy abundante de CAT-V5 en el control positivo (Figura 42). Por otra parte, en las células que contenían la quimera prBIRC5-OATP1B3 se detectó expresión de OATP1B3-V5 por Western Blot, a diferencia de los lisados correspondientes a las células silvestres (Figura 42).

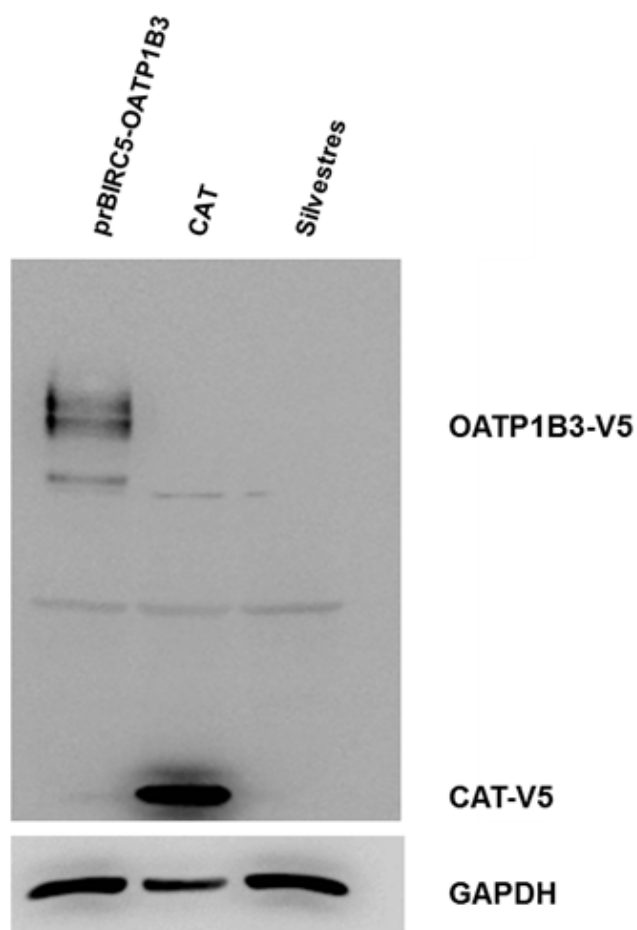


Figura 42. Western blot representativo de la proteína OATP1B3 etiquetada con V5 en lisados de células Alexander que contenían prBIRC5-OATP1B3 y de células silvestres, usando un anticuerpo frente al epítipo V5. Las células se transfectaron con el plásmido pcDNA6.2-prBIRC5-OATP1B3-V5 y se obtuvieron lisados a las 48 h desde la transfección. Como control positivo del marcaje con el anticuerpo se usaron lisados de células que contenían cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)-V5. La expresión de la GAPDH se utilizó como control de carga de la proteína.

4.3.3. EXPRESIÓN ESTABLE DEL GEN QUIMÉRICO prBIRC5-OATP1B3 EN CÉLULAS ALEXANDER

Como ya se comentó en el primer apartado de este bloque, nos planteamos evaluar directamente la funcionalidad de la quimera prBIRC5-OATP1B3 a partir de células Alexander que la expresaran de forma estable.

Se amplificó la secuencia del gen quimérico prBIRC5-OATP1B3 usando como molde el plásmido pcDNA6.2-prBIRC5-OATP1B3-V5 y se clonó en el vector lentiviral genómico siguiendo la metodología propia de la clonación clásica, de manera similar a la que utilizamos en la quimera prMRP2-OATP1B1, entre los sitios *Bpu11021* y *SpeI* del

plásmido pWPI-pL-MCS. Este procedimiento dio como resultado el plásmido retroviral genómico que denominamos pWPI-prBIRC5-OATP1B3 (Figura 43).

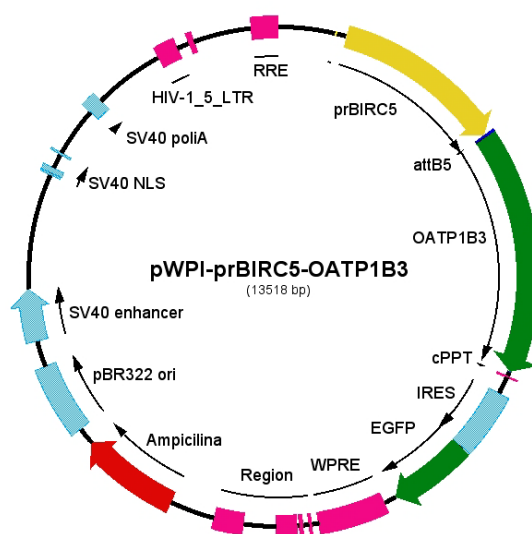


Figura 43. Representación esquemática del plásmido pWPI-prBIRC5-OATP1B3 obtenido tras la inserción de la secuencia del gen quimérico prBIRC5-OATP1B3 en el pWPI-pL-MCS por clonación clásica. En color verde se indican las secuencias codificantes de OATP1B3 y EGFP que están reguladas por el prBIRC5 señalado en amarillo. En rojo se muestra el gen de resistencia a ampicilina.

Se transfectaron células hospedadoras HEK-293T con los plásmidos pWPI-prBIRC5-OATP1B3 y los empaquetadores psPAX2 y pMD2.G para producir lentivirus recombinantes prBIRC5-OATP1B3. Una vez titulados, los virus se usaron para infectar células Alexander. Se analizó la población policlonal obtenida tras la transducción midiendo por citometría de flujo la expresión de la proteína EGFP regulada por el prBIRC5.

En la Figura 44, se muestra un desplazamiento del histograma de fluorescencia de las células que contenían prBIRC5-OATP1B3 con respecto a las células silvestres, debida a la fluorescencia de la EGFP regulada por la actividad del prBIRC5. Al igual que ocurría en las células Alexander transducidas con prMRP2-OATP1B1, la señal fluorescente en la población policlonal del control positivo de células infectadas con lentivirus pWPI, cuya expresión de EGFP estaba regulada por la acción del promotor constitutivo prEF1a, era muy superior. A pesar de que los experimentos de evaluación de la actividad del prBIRC5 a partir de la medida de actividad luciferasa (Figura 39) demostraban que se trataba de un promotor muy activo, comparable al prCMV, los resultados obtenidos con las poblaciones policlonales generadas con los lentivirus recombinantes no se correspondían con lo esperado; probablemente, porque debido al

gran tamaño de los vectores lentivirales genómicos resultantes de la inserción de las quimeras, la eficacia de la transducción disminuía y se veía reflejada en un menor grado de fluorescencia.

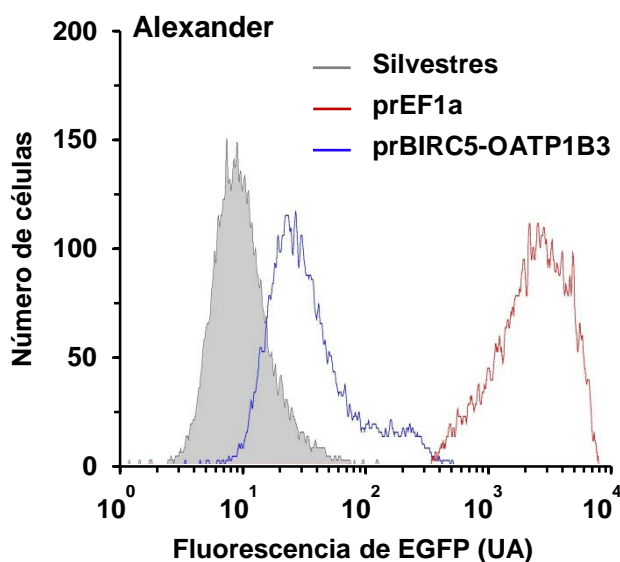


Figura 44. Histograma de frecuencia representativo de la fluorescencia de células Alexander silvestres no infectadas y células infectadas con lentivirus que contenían la quimera prBIRC5-OATP1B3 y la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (EGFP) o la EGFP controlada por el promotor EF1a (prEF1a) usadas como control positivo. La fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo 4 días después de la transducción de las células con lentivirus recombinantes prBIRC5-OATP1B3 y se expresó en unidades arbitrarias (UA).

Como consecuencia del bajo nivel de fluorescencia obtenido en la población policlonal generada, nos planteamos llevar a cabo sobre la misma una selección clonal por el método de dilución límite con el fin de aislar células que presentaran un nivel mayor de expresión de EGFP y, por tanto, un prBIRC5 más activo.

Los clones obtenidos se analizaron por citometría de flujo y dos de ellos, en concreto el 6F y el 8G, destacaron sobre los demás por presentar un nivel de fluorescencia debida a la EGFP regulada por el prBIRC5 aproximadamente 4 veces superior a la emitida por la población primitiva policlonal (Figura 45). Ambos clones se seleccionaron para llevar a cabo estudios posteriores. Por lo general, se obtuvo un nivel de fluorescencia mayor tanto en las células policlonales como en los clones seleccionados que se habían transducido con prBIRC5-OATP1B3 en comparación con las células portadoras de la quimera prMRP2-OATP1B1.

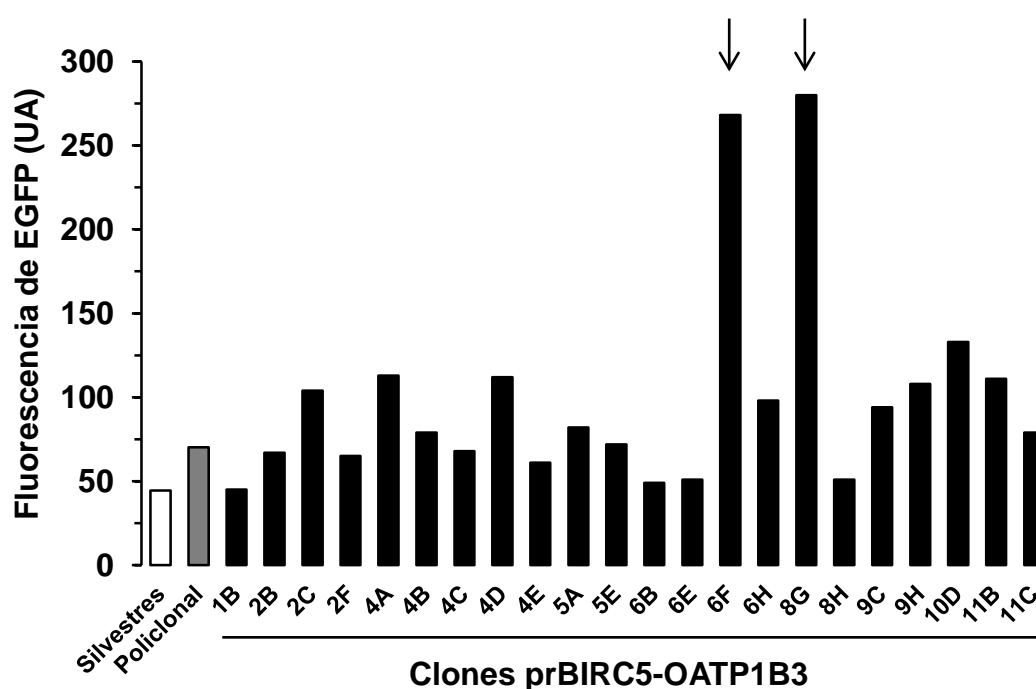


Figura 45. Fluorescencia de la proteína verde fluorescente EGFP de diferentes clones de células Alexander aislados a partir de células policlonales infectadas con lentivirus que contenían la quimera prBIRC5-OATP1B3 y la secuencia codificante de EGFP. Los valores representan la fluorescencia media expresada en unidades arbitrarias (UA) determinada por citometría de flujo de diferentes clones de células Alexander, de una población policlonal y de células silvestres no infectadas. Las flechas indican los clones que se seleccionaron para estudios posteriores.

4.3.4. FUNCIONALIDAD DEL GEN QUIMÉRICO prBIRC5-OATP1B3 EN CÉLULAS ALEXANDER TRANSFECTADAS DE FORMA ESTABLE

Para comprobar la capacidad funcional de la quimera prBIRC5-OATP1B3 en las poblaciones monoclonales 6F y 8G, se diseñó un estudio de captación de colilglicil-amido-fluoresceína (CGamF), un ácido biliar fluorescente que es sustrato de OATP1B3 (Martinez-Becerra, 2011).

Utilizando como control positivo células de ovario de hámster chino (CHO-K1) establemente transfectadas con OATP1B1 y con OATP1B3, pusimos a punto las condiciones para realizar estudios de captación de CGamF por citometría de flujo.

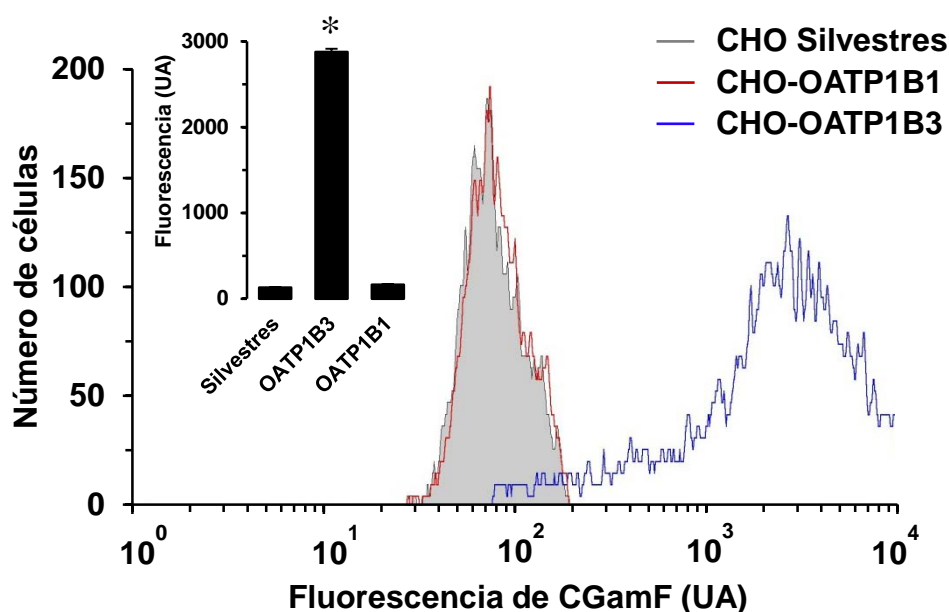


Figura 46. Histogramas de frecuencia representativos de la fluorescencia debida a la captación de CGamF por células de ovario de hámster chino CHO-K1 silvestres y transfectadas de forma estable con OATP1B1 o con OATP1B3. El análisis de la fluorescencia por citometría de flujo se llevó a cabo tras 15 minutos de incubación de las células con 1 μ M de CGamF a 37°C. En el inserto de la Figura, se representa la captación de CGamF, que se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) y representa la media de un triplicado para cada condición experimental. *, $p < 0,05$, comparado con las células silvestres por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Con respecto a las células silvestres, la captación de CGamF era muy superior en las células que expresaban OATP1B3 (Figura 46). Sin embargo, utilizando las mismas condiciones experimentales, no se encontró mayor captación de CGamF en el caso de las células que expresaban OATP1B1, probablemente porque este compuesto no es un buen sustrato de OATP1B1, como se había demostrado en trabajos previos (Martínez-Becerra, 2011). Por ello, este método no se pudo utilizar en el estudio de la funcionalidad de la quimera que contenía OATP1B1. Podría pensarse que la fluorescencia de la EGFP pudiera interferir en la medida, ya que se mide con el mismo filtro de emisión que la CGamF. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 46, la fluorescencia debida a la captación de CGamF fue de varios órdenes de magnitud superior a la de EGFP.

En las mismas condiciones que el experimento anterior, se determinó la captación de CGamF por los clones 6F y 8G que contenían prBIRC5-OATP1B3 (Figura 47). También incluimos en el estudio, como control negativo, además de las células no infectadas, un clon con baja expresión de OATP1B3, el 6E.

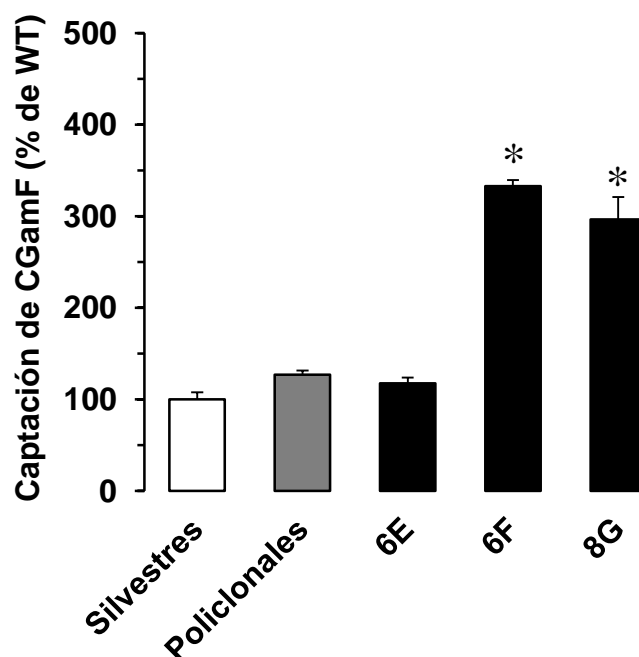


Figura 47. Captación de CGamF por células Alexander policlonales infectadas con lentivirus que contenían la quimera prBIRC5-OATP1B3 y los clones 6E, 6F y 8G derivados de la misma. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) y representan la media de un triplicado para cada condición experimental. *, $p < 0,05$, comparado con las células silvestres por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Los resultados indicaban que el nivel de fluorescencia debido a la captación de CGamF era elevado y similar en el caso de los clones 6F y 8G, mientras que la señal de fluorescencia en el caso del clon 6E, fue similar a la de las células no infectadas. Estos resultados sugerían que los clones 6F y 8G de células Alexander expresaban una proteína OATP1B3 funcional. Aunque la captación de CGamF fue muy similar por las células 6F y 8G, para investigar el efecto quimiosensibilizante de la quimera prBIRC5-OATP1B3 en las células Alexander, se seleccionó el primero de ellos, por ser el nivel de fluorescencia un poco mayor.

La evaluación de la quimera prBIRC5-OATP1B3 como estrategia de quimiosensibilización de células tumorales se llevó a cabo sobre la población celular monoclonal 6F infectada con lentivirus recombinantes prBIRC5-OATP1B3 o células Alexander infectadas con lentivirus pWPI usadas como control.

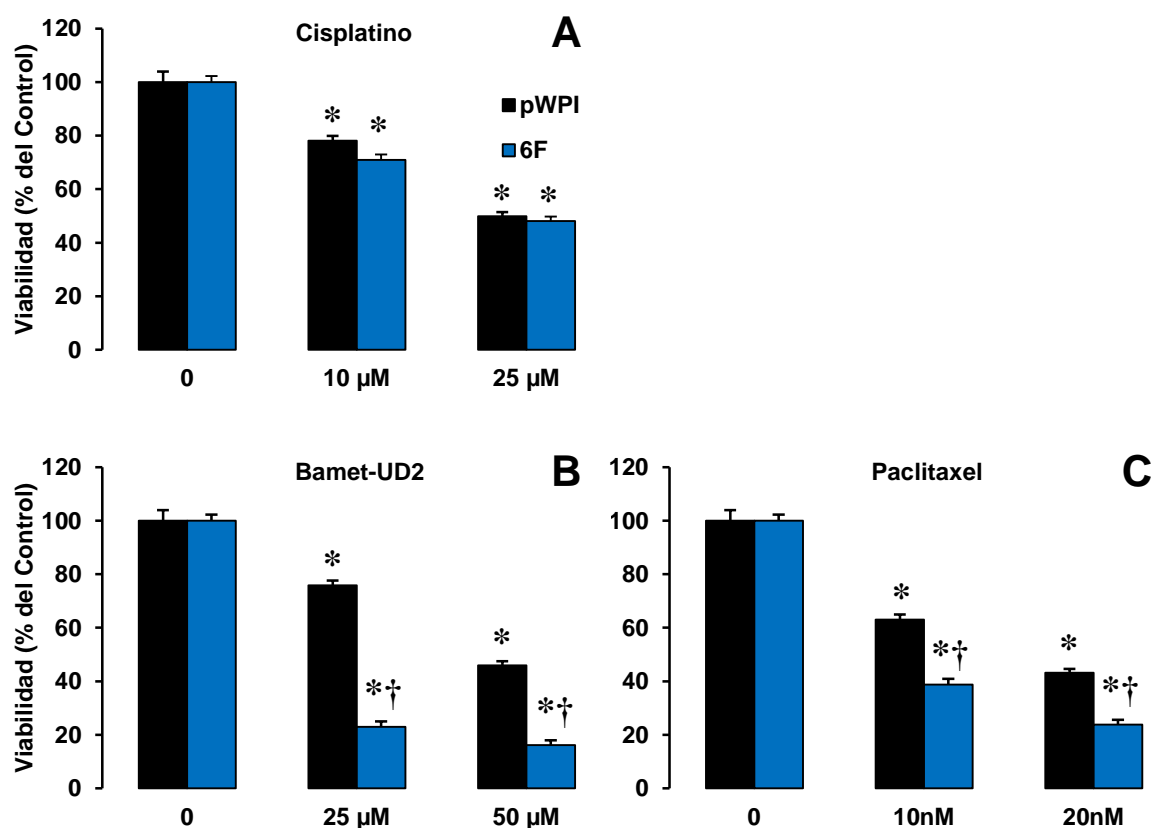


Figura 48. Efecto citostático del cisplatino (A), del Bamet-UD2 (B) y del paclitaxel (C) en células Alexander que expresaban de forma estable prBIRC5-OATP1B3. Las células transducidas con lentivirus pWPI o lentivirus recombinantes prBIRC5-OATP1B3 fueron expuestas a los distintos fármacos antitumorales (cisplatino, Bamet-UD2 y paclitaxel), durante 72 h. Los valores se expresan en porcentaje del Control (100%) y son media \pm SD de 3 experimentos realizados por triplicado. *, $p < 0,05$, comparado con células no tratadas. †, $p < 0,05$, comparado con células pWPI por el test de *t* de Student.

Se eligieron los mismos fármacos antitumorales empleados en la evaluación de la quimiosensibilización de la quimera prMRP2-OATP1B1, puesto que el paclitaxel y el derivado de platino y ácidos biliares Bamet-UD2 también son sustratos de OATP1B3.

Los tres fármacos citostáticos ensayados sobre las células control causaron una pérdida de la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis (Figura 48). El efecto antiproliferativo del cisplatino fue similar en los dos tipos celulares (Figura 48A). En los casos del tratamiento con paclitaxel y Bamet-UD2 se observó un comportamiento similar, una pérdida mayor de la viabilidad en las células que contenían prBIRC5-OATP1B3 con respecto a las células control.

Los resultados obtenidos demuestran el efecto quimiosensibilizante del gen quimérico prBIRC5-OATP1B3 en este tipo de células en las que se ha comprobado que

el prBIRC5 es activo transcripcionalmente. Esta estrategia de terapia génica en células de HCC, combinada con quimioterapia basada tan sólo en la administración de fármacos antitumorales sustratos de OATP1B3, reduce la viabilidad de las células tumorales, como consecuencia de la estimulación de la expresión del gen quimérico por el propio patrón de sobreexpresión de *BIRC5* en las células tumorales.

Aunque muchos de los aspectos discutidos en referencia a la quimera prMRP2-OATP1B1 son aplicables también a la estrategia de terapia génica basada en el gen quimérico prBIRC5-OATP1B3, la diferencia más importante de esta última con respecto a la anterior es su especificidad de acción sobre el tejido tumoral, como consecuencia de una expresión específica de *BIRC5* en tumores y no en tejido sano. Esto podría traer como consecuencia una reducción de la toxicidad derivada de la administración sistémica de la quimioterapia, puesto que el efecto citotóxico de la misma será mayor sobre las células tumorales que contienen el gen quimérico y no sobre las células sanas. La especificidad se podría aumentar aún más usando fármacos vectorizados hacia el tejido hepático, como es el caso de los Bamet. Aunque el tejido hepático sano también captase los fármacos citostáticos, la polarización de los hepatocitos sanos favorece su rápida eliminación desde la sangre portal hacia la bilis previniendo de esta forma que se alcancen concentraciones tóxicas en estas células. Sin embargo, es de esperar que ocurriese lo contrario en el tejido tumoral en el que se impusiese la expresión de OATP1B3, que ha perdido esta propiedad de transporte vectorial característica de las células epiteliales polarizadas.

Aunque en este trabajo se plantea el uso de prBIRC5-OATP1B3 como estrategia para superar la quimiorresistencia del HCC por tratarse OATP1B3 de una proteína de captación que presenta expresión hepática de forma casi exclusiva en condiciones normales y se ve reducida en tumores, lo cierto es que puede ser aplicable a otros tipos de cáncer que tienen como característica común la alta expresión de la survivina.

En los últimos años, la elección de la survivina como diana terapéutica antitumoral ha cobrado gran importancia en el campo de la terapia génica. Algunos ejemplos de estrategias de terapia génica suicida desarrolladas están basadas en la expresión dirigida por la actividad transcripcional del prBIRC5 de genes proapoptóticos (Garg, 2010), de fitotoxinas (Wang, 2013) y de la timidina quinasa del virus del herpes simple combinada con el ganciclovir (Qu, 2013). Todas ellas han resultado eficaces. Por ello, la utilización de un gen suicida cuya expresión esté dirigida por el prBIRC5 garantiza especificidad y una reducción de la toxicidad, a diferencia de lo que ocurre cuando se emplean promotores que dirigen una expresión constitutiva.

*Desarrollo de nuevas
herramientas biotecnológicas para
la manipulación de la
quimiorresistencia y como
biosensores de agentes
genotóxicos*



5. CONCLUSIONES

Conclusión primera:

Se ha desarrollado el biosensor prRecA-Luc2 basado en la respuesta SOS que tiene como elemento de reconocimiento bacterias *E.coli* BL21(DE3) y como transductor el plásmido que contiene la luciferasa bajo el control del promotor del gen *recA*.

Conclusión segunda:

Se ha puesto a punto un ensayo *in vitro* de genotoxicidad en el que se han fijado las condiciones óptimas de medida de la actividad luciferasa en situaciones de actividad del prRecA basal o inducida por agentes genotóxicos.

Conclusión tercera:

El uso del biosensor microbiano prRecA-Luc2 ha sido útil para detectar la capacidad genotóxica de diferentes contaminantes ambientales caracterizados por un mecanismo de daño directo sobre el ADN y que pueden contaminar la alimentación del ganado. También ha permitido determinar el papel genotóxico y carcinogénico de los metabolitos de la tioacetamida, así como descartar que los ácidos biliares por sí solos, tengan un papel iniciador como agentes genotóxicos en el desarrollo de colangiocarcinomas.

Conclusión cuarta:

La estrategia de terapia génica basada en la fusión transcripcional de un promotor activo e inducible en células de hepatoma humano, como el del gen *ABCC2*, con la proteína de captación OATP1B1, es útil para mejorar la eficacia del tratamiento con fármacos antitumorales sustratos de OATP1B1 y su eficacia puede ser potenciada en quimioterapia combinada con un activador del promotor de MRP2, como la dexametasona.

Conclusión quinta:

En células tumorales en las que durante el tratamiento se ha perdido sensibilidad a la quimioterapia debido, en parte, a la sobreexpresión de proteínas de quimiorresistencia, como la MRP2, el uso de la estrategia quimiosensibilizante basada en el gen quimérico prMRP2-OATP1B1 restituye la respuesta antitumoral a los fármacos citostáticos que sean sustrato de OATP1B1.

Conclusión sexta:

Se ha desarrollado otra estrategia de terapia génica complementaria basada en la fusión transcripcional de OATP1B3 con el promotor del gen *BIRC5*, cuya elevada actividad en los tumores contrasta con su casi ausencia de expresión en las células sanas. Esta estrategia cuenta con dos ventajas importantes: su alta selectividad en lo que se refiere a la sensibilización específica de las células tumorales y la frecuente presencia de la característica determinante de sobre-activación del promotor de *BIRC5* en muchos tipos tumorales, lo que amplía las expectativas de su utilización.

*Desarrollo de nuevas
herramientas biotecnológicas para
la manipulación de la
quimiorresistencia y como
biosensores de agentes
genotóxicos*



6. BIBLIOGRAFÍA

- Aas P.A., Otterlei M., Falnes P.O., Vagbo C.B., Skorpen F., Akbari M., Sundheim O., Bjoras M., Slupphaug G., Seeberg E., Krokan H.E. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421(6925): 859-63, 2003.
- Abbotts R., Thompson N., Madhusudan S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. *Cancer Manag Res* 6: 77-92, 2014.
- Abraham R.T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15(17): 2177-96, 2001.
- Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3(8): 917-21, 1997.
- Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31(6): 347-64, 1975.
- Araki M., Masutani C., Takemura M., Uchida A., Sugasawa K., Kondoh J., Ohkuma Y., Hanaoka F. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276(22): 18665-72, 2001.
- Aravind L., Koonin E.V. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and IpreCAN define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol* 2(3): RESEARCH0007, 2001.
- Arenson T.A., Tsodikov O.V., Cox M.M. Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. *J Mol Biol* 288(3): 391-401, 1999.
- Arikawa Y., Ikebukuro K., Karube I. *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*. Secaucus (EE.UU.), Ed. Springer Protocols, 1998.
- Badagnani I., Castro R.A., Taylor T.R., Brett C.M., Huang C.C., Stryke D., Kawamoto M., Johns S.J., Ferrin T.E., Carlson E.J., Burchard E.G., Giacomini K.M. Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther* 318(2): 521-9, 2006.
- Barker E.A., Smuckler E.A. Nonhepatic thioacetamide injury. II. The morphologic features of proximal renal tubular injury. *Am J Pathol* 74(3): 575-90, 1974.
- Bassing C.H., Alt F.W. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 781-96, 2004.
- Bebenek K., Tissier A., Frank E.G., McDonald J.P., Prasad R., Wilson S.H., Woodgate R., Kunkel T.A. 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science* 291(5511): 2156-9, 2001.
- Benjdia A. DNA photolyases and SP lyase: structure and mechanism of light-dependent and independent DNA lyases. *Curr Opin Struct Biol* 22(6): 711-20, 2012.
- Benson A.B., 3rd. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm* 13(6 Suppl C): S5-18, 2007.
- Beranek D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231(1): 11-30, 1990.
- Bernstein H., Bernstein C., Payne C.M., Dvorak K. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 15(27): 3329-40, 2009.
- Berry M.N., Friend D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43(3): 506-20, 1969.

- Beyersmann D., Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82(8): 493-512, 2008.
- Bjerketorp J., Hakansson S., Belkin S., Jansson J.K. Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active. *Curr Opin Biotechnol* 17(1): 43-9, 2006.
- Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411(6835): 355-65, 2001.
- Briz O., Macias R.I., Vallejo M., Silva A., Serrano M.A., Marin J.J. Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumors. *Mol Pharmacol* 63(3): 742-50, 2003.
- Briz O., Serrano M.A., Rebollo N., Hagenbuch B., Meier P.J., Koepsell H., Marin J.J. Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholyglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol* 61(4): 853-60, 2002.
- Brooks P.J. The case for 8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides as endogenous DNA lesions that cause neurodegeneration in xeroderma pigmentosum. *Neuroscience* 145(4): 1407-17, 2007.
- Brosh R.M., Jr. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nat Rev Cancer* 13(8): 542-58, 2013.
- Brown T.A. *Genomas*. Buenos Aires (Argentina), Ed. Médica Panamericana 2008.
- Bryant F.R. Construction of a recombinase-deficient mutant recA protein that retains single-stranded DNA-dependent ATPase activity. *J Biol Chem* 263(18): 8716-23, 1988.
- Burma S., Chen D.J. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 909-18, 2004.
- Buxhofer-Ausch V., Secky L., Wlcek K., Svoboda M., Kounnis V., Briasoulis E., Tzakos A.G., Jaeger W., Thalhammer T. Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy. *J Drug Deliv* 2013: 863539, 2013.
- Byfield M.P., Abuknesha R.A. Biochemical aspects of biosensors. *Biosens Bioelectron* 9(4-5): 373-400, 1994.
- Cappelli E., Taylor R., Cevasco M., Abbondandolo A., Caldecott K., Frosina G. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J Biol Chem* 272(38): 23970-5, 1997.
- Caron P.R., Kushner S.R., Grossman L. Involvement of helicase II (uvrD gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the uvrABC protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(15): 4925-9, 1985.
- Chambers J.P., Arulanandam B.P., Matta L.L., Weis A., Valdes J.J. Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol* 10(1-2): 1-12, 2008.
- Chandra P., Brouwer K.L. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 21(5): 719-35, 2004.
- Chao H.P., Lee W.C. A bioelectrode for penicillin detection based on gluten-membrane-entrapped microbial cells. *Biotechnol Appl Biochem* 32 (Pt 1): 9-14, 2000.
- Chaudhuri S.K., Lovley D.R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol* 21(10): 1229-32, 2003.

- Chen J.S., Liu J.C., Shen L., Rau K.M., Kuo H.P., Li Y.M., Shi D., Lee Y.C., Chang K.J., Hung M.C. Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy. *Cancer Gene Ther* 11(11): 740-7, 2004.
- Churchill J.J., Anderson D.G., Kowalczykowski S.C. The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of chi, resulting in constitutive recombination activation. *Genes Dev* 13(7): 901-11, 1999.
- Clark L.C., Jr., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* 102: 29-45, 1962.
- Coin F., Oksenysh V., Egly J.M. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell* 26(2): 245-56, 2007.
- Criado J.J., Dominguez M.F., Medarde M., Fernandez E.R., Macias R.I., Marin J.J. Structural characterization, kinetic studies, and in vitro biological activity of new cis-diamminebis-cholyglycinate(O,O') Pt(II) and cis-diamminebis-ursodeoxycholate(O,O') Pt(II) complexes. *Bioconjug Chem* 11(2): 167-74, 2000.
- Criado J.J., Herrera M.C., Palomero M.F., Medarde M., Rodriguez E., Marin J.J. Synthesis and characterization of a new bile acid and platinum(II) complex with cytostatic activity. *J Lipid Res* 38(5): 1022-32, 1997.
- Criado J.J., Macias R.I., Medarde M., Monte M.J., Serrano M.A., Marin J.J. Synthesis and characterization of the new cytostatic complex cis-diammineplatinum(II)-chlorocholyglycinate. *Bioconjug Chem* 8(4): 453-8, 1997.
- Dalby B., Cates S., Harris A., Ohki E.C., Tilkins M.L., Price P.J., Ciccarone V.C. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33(2): 95-103, 2004.
- Daniels D.S., Woo T.T., Luu K.X., Noll D.M., Clarke N.D., Pegg A.E., Tainer J.A. DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol* 11(8): 714-20, 2004.
- Dao V., Modrich P. Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. *J Biol Chem* 273(15): 9202-7, 1998.
- Dashti H.M., Mathew T.C., Jadaon M.M., Ashkanani E. Zinc and liver cirrhosis: biochemical and histopathologic assessment. *Nutrition* 13(3): 206-12, 1997.
- de Groen P.C., Gores G.J., LaRusso N.F., Gunderson L.L., Nagorney D.M. Biliary tract cancers. *N Engl J Med* 341(18): 1368-78, 1999.
- de Lope C.R., Tremosini S., Forner A., Reig M., Bruix J. Management of HCC. *J Hepatol* 56 Suppl 1: S75-87, 2012.
- de Lope C.R., Tremosini S., Forner A., Reig M., Bruix J. Management of HCC. *J Hepatol* 56 Suppl 1: S75-87, 2012.
- Dean M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* 400: 409-29, 2005.
- Degrassi F., Fiore M., Palitti F. Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4(4): 317-25, 2004.
- Delaney J.C., Essigmann J.M. Mutagenesis, genotoxicity, and repair of 1-methyladenine, 3-alkylcytosines, 1-methylguanine, and 3-methylthymine in alkB *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39): 14051-6, 2004.

- DellaVecchia M.J., Croteau D.L., Skovvaga M., Dezhurov S.V., Lavrik O.I., Van Houten B. Analyzing the handoff of DNA from UvrA to UvrB utilizing DNA-protein photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 279(43): 45245-56, 2004.
- Demidov V.V., Potaman V.N., Frank-Kamenetskii M.D., Egholm M., Buchard O., Sonnichsen S.H., Nielsen P.E. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol* 48(6): 1310-3, 1994.
- Demple B., Sedgwick B., Robins P., Totty N., Waterfield M.D., Lindahl T. Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(9): 2688-92, 1985.
- Deshpande A., D'Souza S.F., Nadkarni G.B. Immobilization of microbial cells in gelatine using gamma-irradiation. *Indian J Biochem Biophys* 23(6): 353-4, 1986.
- Ding L., Du D., Zhang X., Ju H. Trends in cell-based electrochemical biosensors. *Curr Med Chem* 15(30): 3160-70, 2008.
- Dinglay S., Trewick S.C., Lindahl T., Sedgwick B. Defective processing of methylated single-stranded DNA by *E. coli* AlkB mutants. *Genes Dev* 14(16): 2097-105, 2000.
- Dizdaroglu M., Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 46(4): 382-419, 2012.
- Dominguez M.F., Macias R.I., Izco-Basurko I., de La Fuente A., Pascual M.J., Criado J.M., Monte M.J., Yajeya J., Marin J.J. Low in vivo toxicity of a novel cisplatin-ursodeoxycholic derivative (Bamet-UD2) with enhanced cytostatic activity versus liver tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 297(3): 1106-12, 2001.
- Douki T., Reynaud-Angelin A., Cadet J., Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* 42(30): 9221-6, 2003.
- D'Souza S.F. Cosmotic stabilization of mitochondria using chemical crosslinkers. *Biotechnol Bioeng* 25(6): 1661-4, 1983.
- D'Souza S.F. Microbial biosensors. *Biosens Bioelectron* 16(6): 337-53, 2001.
- D'Souza S.F., Melo J.S. A method for the preparation of coimmobilizates by adhesion using polyethylenimine. *Enzyme Microb Technol* 13(6): 508-11, 1991.
- Dudley R.E., Svoboda D.J., Klaassen C. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 65(2): 302-13, 1982.
- Duncan T., Trewick S.C., Koivisto P., Bates P.A., Lindahl T., Sedgwick B. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16660-5, 2002.
- Dyroff M.C., Neal R.A. Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res* 41(9 Pt 1): 3430-5, 1981.
- Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365(6446): 566-8, 1993.
- Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346(6287): 818-22, 1990.
- Erden P.E., Kilic E. A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. *Talanta* 107: 312-23, 2013.

- Evrard A., Cuq P., Ciccolini J., Vian L., Cano J.P. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 80(11): 1726-33, 1999.
- Fahrer J., Kaina B. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. *Carcinogenesis* 34(11): 2435-42, 2013.
- Falnes P.O., Bjoras M., Aas P.A., Sundheim O., Seeberg E. Substrate specificities of bacterial and human AlkB proteins. *Nucleic Acids Res* 32(11): 3456-61, 2004.
- Fang Q., Kanugula S., Pegg A.E. Function of domains of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Biochemistry* 44(46): 15396-405, 2005.
- Fautrel A., Andrieux L., Musso O., Boudjema K., Guillouzo A., Langouet S. Overexpression of the two nucleotide excision repair genes ERCC1 and XPC in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 43(2): 288-93, 2005.
- Featherstone C., Jackson S.P. DNA double-strand break repair. *Curr Biol* 9(20): R759-61, 1999.
- Fitzhugh O.G., Nelson A.A. Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide. *Science* 108(2814): 626-8, 1948.
- Folmer Y., Schneider M., Blum H.E., Hafkemeyer P. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-ABCC2 antisense constructs. *Cancer Gene Ther* 14(11): 875-84, 2007.
- Fornier A., Llovet J.M., Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379(9822): 1245-55, 2012.
- Fortini P., Pascucci B., Parlanti E., Sobol R.W., Wilson S.H., Dogliotti E. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37(11): 3575-80, 1998.
- Friedman N., Vardi S., Ronen M., Alon U., Stavans J. Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. *PLoS Biol* 3(7): e238, 2005.
- Fu D., Calvo J.A., Samson L.D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* 12(2): 104-20, 2012.
- Gamella M., Campuzano S., Manso J., Gonzalez de Rivera G., Lopez-Colino F., Reviejo A.J., Pingarron J.M. A novel non-invasive electrochemical biosensing device for in situ determination of the alcohol content in blood by monitoring ethanol in sweat. *Anal Chim Acta* 806: 1-7, 2014.
- García-Campaña A.M., Baeyens W.R.G. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. Nueva York (EE.UU.), Ed. CRC Press, 2001.
- Garcia-Diaz M., Bebenek K., Kunkel T.A., Blanco L. Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. *J Biol Chem* 276(37): 34659-63, 2001.
- Garcia-Leston J., Mendez J., Pasaro E., Laffon B. Genotoxic effects of lead: an updated review. *Environ Int* 36(6): 623-36, 2010.
- Garg H., Salcedo R., Trinchieri G., Blumenthal R. Improved nonviral cancer suicide gene therapy using survivin promoter-driven mutant Bax. *Cancer Gene Ther* 17(3): 155-63, 2010.
- Gibb H.J., Lees P.S., Pinsky P.F., Rooney B.C. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 38(2): 115-26, 2000.

- Gillet J.P., Efferth T., Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta* 1775(2): 237-62, 2007.
- González-Rumayor V., García-Iglesias E., Ruiz-Galán O., Gago-Cabezas L. *Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria*. Madrid, Ed. CEIM y Dirección General de Universidades e Investigación, 2005.
- Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12): 4645-9, 1990.
- Gu L., Hong Y., McCulloch S., Watanabe H., Li G.M. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res* 26(5): 1173-8, 1998.
- Hagenbuch B., Meier P.J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447(5): 653-65, 2004.
- Haimeur A., Conseil G., Deeley R.G., Cole S.P. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 5(1): 21-53, 2004.
- Hamada K., Umemoto A., Kajikawa A., Seraj M.J., Monden Y. In vitro formation of DNA adducts with bile acids. *Carcinogenesis* 15(9): 1911-5, 1994.
- Han T.S., Sasaki S., Yano K., Ikebukuro K., Kitayama A., Nagamune T., Karube I. Flow injection microbial trichloroethylene sensor. *Talanta* 57(2): 271-6, 2002.
- Hanawalt P.C., Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12): 958-70, 2008.
- Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10(11): 1788-95, 2000.
- Hartwig A., Schleppegrell R., Beyersmann D. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 241(1): 75-82, 1990.
- Heller A. Concepts of electrically connecting redox enzymes to metal electrodes. *Am Biotechnol Lab* 8(8): 14-6, 1990.
- Herraez E., Gonzalez-Sanchez E., Vaquero J., Romero M.R., Serrano M.A., Marin J.J., Briz O. Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Mol Pharm* 9(9): 2565-76, 2012.
- Herraez E., Lozano E., Macias R.I., Vaquero J., Bujanda L., Banales J.M., Marin J.J., Briz O. Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology* 58(3): 1065-73, 2013.
- Hesselberth J.R., Robertson M.P., Knudsen S.M., Ellington A.D. Simultaneous detection of diverse analytes with an aptazyme ligase array. *Anal Biochem* 312(2): 106-12, 2003.
- Hinoshita E., Uchiumi T., Taguchi K., Kinukawa N., Tsuneyoshi M., Maehara Y., Sugimachi K., Kuwano M. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 6(6): 2401-7, 2000.
- Holzer A.K., Katano K., Klomp L.W., Howell S.B. Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10(19): 6744-9, 2004.

- Horii T., Ogawa T., Nakatani T., Hase T., Matsubara H., Ogawa H. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell* 27(3 Pt 2): 515-22, 1981.
- Huang Y., Anderle P., Bussey K.J., Barbacioru C., Shankavaram U., Dai Z., Reinhold W.C., Papp A., Weinstein J.N., Sadee W. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 64(12): 4294-301, 2004.
- Hunter A.L., Holscher M.A., Neal R.A. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 200(2): 439-48, 1977.
- Janion C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci* 4(6): 338-44, 2008.
- Jansen A., Gemayel R., Verstrepen K.J. Unstable microsatellite repeats facilitate rapid evolution of coding and regulatory sequences. *Genome Dyn* 7: 108-25, 2012.
- Jedlitschky G., Hoffmann U., Kroemer H.K. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(3): 351-66, 2006.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2): 69-90, 2011.
- Johnson F.M. The genetic effects of environmental lead. *Mutat Res* 410(2): 123-40, 1998.
- Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): a review. *Water Res* 49: 62-82, 2014.
- Kato T., Yano K., Ikebukuro K., Karube I. Bioassay of bile acids using an enzyme-linked DNA aptamer. *Analyst* 125(8): 1371-3, 2000.
- Kim B., Cha G.S., Meyerhoff M.E. Homogeneous enzyme-linked binding assay for studying the interaction of lectins with carbohydrates and glycoproteins. *Anal Chem* 62(24): 2663-8, 1990.
- Kim P.J., Plescia J., Clevers H., Fearon E.R., Altieri D.C. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 362(9379): 205-9, 2003.
- Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517): 495-7, 1975.
- Koivisto P., Duncan T., Lindahl T., Sedgwick B. Minimal methylated substrate and extended substrate range of *Escherichia coli* AlkB protein, a 1-methyladenine-DNA dioxygenase. *J Biol Chem* 278(45): 44348-54, 2003.
- Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J., Juijn J.A., Baas F., Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57(16): 3537-47, 1997.
- Kostrzynska M., Leung K.T., Lee H., Trevors J.T. Green fluorescent protein-based biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic compounds. *J Microbiol Methods* 48(1): 43-51, 2002.
- Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D., Rehrauer W.M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58(3): 401-65, 1994.

- Kowalski P., Surowiak P., Lage H. Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP. *Mol Ther* 11(4): 508-22, 2005.
- Krogh B.O., Symington L.S. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* 38: 233-71, 2004.
- Krokan H.E., Standal R., Slupphaug G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325 (Pt 1): 1-16, 1997.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125, 2006.
- Kullak-Ublick G.A., Beuers U., Paumgartner G. Molecular and functional characterization of bile acid transport in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Hepatology* 23(5): 1053-60, 1996.
- Kunkel T.A., Erie D.A. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74: 681-710, 2005.
- Kuroda H., Kutner R.H., Bazan N.G., Reiser J. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J Virol Methods* 157(2): 113-21, 2009.
- Kuzminov A. Recombinational repair of DNA damage in Escherichia coli and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(4): 751-813, table of contents, 1999.
- Laible M., Boonrod K. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *J Vis Exp*(27), 2009.
- Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58: 913-49, 1989.
- Lazaridis K.N., Gores G.J. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 128(6): 1655-67, 2005.
- Leabman M.K., Huang C.C., DeYoung J., Carlson E.J., Taylor T.R., de la Cruz M., Johns S.J., Stryke D., Kawamoto M., Urban T.J., Kroetz D.L., Ferrin T.E., Clark A.G., Risch N., Herskowitz I., Giacomini K.M., Pharmacogenetics Of Membrane Transporters I. Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5896-901, 2003.
- Lee J.Y., Chang J., Joseph N., Ghirlando R., Rao D.N., Yang W. MutH complexed with hemi- and unmethylated DNAs: coupling base recognition and DNA cleavage. *Mol Cell* 20(1): 155-66, 2005.
- Lee M., Walt D.R. A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal Biochem* 282(1): 142-6, 2000.
- Lee S.M., Hwang K.S., Kim S.K., Kim T.S. Protocol for the use of a silica nanoparticle-enhanced microcantilever sensor-based method to detect HBV at femtomolar concentrations. *Methods Mol Biol* 903: 283-93, 2012.
- Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Microbial biosensors. *Anal Chim Acta* 568(1-2): 200-10, 2006.
- Letschert K., Keppler D., Konig J. Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics* 14(7): 441-52, 2004.

- Lewis L.K., Harlow G.R., Gregg-Jolly L.A., Mount D.W. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 241(4): 507-23, 1994.
- Li G.M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18(1): 85-98, 2008.
- Lim A., Li B.F. The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. *EMBO J* 15(15): 4050-60, 1996.
- Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A., Kramer M.F. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev* 18(4): 583-607, 2005.
- Lin J.J., Sancar A. Active site of (A)BC excinuclease. I. Evidence for 5' incision by UvrC through a catalytic site involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 residues. *J Biol Chem* 267(25): 17688-92, 1992.
- Lin R.H., Lee C.H., Chen W.K., Lin-Shiau S.Y. Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Environ Mol Mutagen* 23(2): 143-9, 1994.
- Little J.W. Control of the SOS regulatory system by the level of RecA protease. *Biochimie* 64(8-9): 585-9, 1982.
- Llovet J.M., Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 37(2): 429-42, 2003.
- Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V., Hilgard P., Gane E., Blanc J.F., de Oliveira A.C., Santoro A., Raoul J.L., Forner A., Schwartz M., Porta C., Zeuzem S., Bolondi L., Greten T.F., Galle P.R., Seitz J.F., Borbath I., Haussinger D., Giannaris T., Shan M., Moscovici M., Voliotis D., Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359(4): 378-90, 2008.
- Longley M.J., Pierce A.J., Modrich P. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* 272(16): 10917-21, 1997.
- Loranger C., Carpentier R. A fast bioassay for phytotoxicity measurements using immobilized photosynthetic membranes. *Biotechnol Bioeng* 44(2): 178-83, 1994.
- Lusetti S.L., Drees J.C., Stohl E.A., Seifert H.S., Cox M.M. The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA function. *J Biol Chem* 279(53): 55073-9, 2004.
- Magnani E., Bartling L., Hake S. From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event. *BMC Mol Biol* 7: 46, 2006.
- Maillard O., Solyom S., Naegeli H. An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biol* 5(4): e79, 2007.
- Marin J.J., Briz O., Monte M.J., Blazquez A.G., Macias R.I. Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 12(4): 402-38, 2012.
- Marin J.J., Macias R.I., Briz O., Perez M.J., Blazquez A.G., Arrese M., Serrano M.A. Molecular bases of the fetal liver-placenta-maternal liver excretory pathway for cholephilic compounds. *Liver Int* 28(4): 435-54, 2008.
- Marin J.J., Romero M.R., Briz O. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem* 17(8): 709-40, 2010.

- Marin J.J., Romero M.R., Martinez-Becerra P., Herraes E., Briz O. Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Curr Mol Med* 9(9): 1108-29, 2009.
- Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87(1): 206-10, 1978.
- Marolia K.Z., D'Souza S.F. Enhancement in the lysozyme activity of the hen egg white foam matrix by cross-linking in the presence of N-acetyl glucosamine. *J Biochem Biophys Methods* 39(1-2): 115-7, 1999.
- Marshall N.J., Goodwin C.J., Holt S.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5(2): 69-84, 1995.
- Martinez-Becerra P., Briz O., Romero M.R., Macias R.I., Perez M.J., Sancho-Mateo C., Lostao M.P., Fernandez-Abalos J.M., Marin J.J. Further characterization of the electrogenic and pH sensitivity of the human organic anion-transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3. *Mol Pharmacol* 79(3): 596-607, 2011.
- Martinez-Becerra P., Vaquero J., Romero M.R., Lozano E., Anadon C., Macias R.I., Serrano M.A., Grane-Boladeras N., Munoz-Bellvis L., Alvarez L., Sangro B., Pastor-Anglada M., Marin J.J. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm* 9(6): 1693-704, 2012.
- Mathijssen R.H., van Alphen R.J., Verweij J., Loos W.J., Nooter K., Stoter G., Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 7(8): 2182-94, 2001.
- Matsumoto Y., Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269(5224): 699-702, 1995.
- Mattiasson B. Biospecific reversible immobilization : A method for introducing labile structures into analytical systems. *Appl Biochem Biotechnol* 7(1-2): 121-5, 1982.
- Mazon G., Erill I., Campoy S., Cortes P., Forano E., Barbe J. Reconstruction of the evolutionary history of the LexA-binding sequence. *Microbiology* 150(Pt 11): 3783-95, 2004.
- McPartland A., Green L., Echols H. Control of recA gene RNA in E. coli: regulatory and signal genes. *Cell* 20(3): 731-7, 1980.
- Meighen E.A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* 55(1): 123-42, 1991.
- Michel B. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol* 3(7): e255, 2005.
- Misra R.R., Smith G.T., Waalkes M.P. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. *Toxicology* 126(2): 103-14, 1998.
- Mitra S. MGMT: a personal perspective. *DNA Repair (Amst)* 6(8): 1064-70, 2007.
- Miyahara K., Nouse K., Yamamoto K. Chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in the sorafenib age. *World J Gastroenterol* 20(15): 4151-9, 2014.
- Modrich P., Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65: 101-33, 1996.

- Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected]. *Nature* 403(6768): 451-6, 2000.
- Monte M.J., Dominguez S., Palomero M.F., Macias R.I., Marin J.J. Further evidence of the usefulness of bile acids as molecules for shuttling cytostatic drugs toward liver tumors. *J Hepatol* 31(3): 521-8, 1999.
- Morgan S.E., Kelley M.R., Pieper R.O. The role of the carboxyl-terminal tail in human O6-methylguanine DNA methyltransferase substrate specificity and temperature sensitivity. *J Biol Chem* 268(26): 19802-9, 1993.
- Morinaga S., Nakamura Y., Ishiwa N., Yoshikawa T., Noguchi Y., Yamamoto Y., Rino Y., Imada T., Takanashi Y., Akaike M., Sugimasa Y., Takemiya S. Expression of survivin mRNA associates with apoptosis, proliferation and histologically aggressive features in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 12(6): 1189-94, 2004.
- Moser J., Kool H., Giakzidis I., Caldecott K., Mullenders L.H., Fousteri M.I. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell* 27(2): 311-23, 2007.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63, 1983.
- Mulchandani A., Kaneva I., Chen W. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant Escherichia coli with surface-expressed organophosphorus hydrolase. 2. Fiber-optic microbial biosensor. *Anal Chem* 70(23): 5042-6, 1998.
- Muller P.A., Vousden K.H. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15(1): 2-8, 2013.
- Müller-Sterl W. *Bioquímica: fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Barcelona, Ed. Reverté, 2008.
- Murugaiyan S.B., Ramasamy R., Gopal N., Kuzhandaivelu V. Biosensors in clinical chemistry: An overview. *Adv Biomed Res* 3: 67, 2014.
- Nair P.P., Davis K.E., Shami S., Lagerholm S. The induction of SOS function in Escherichia coli K-12/PQ37 by 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) and fecapentaenes-12 and -14 is bile salt sensitive: implications for colon carcinogenesis. *Mutat Res* 447(2): 179-85, 2000.
- Nakamura H., Karube I. Current research activity in biosensors. *Anal Bioanal Chem* 377(3): 446-68, 2003.
- National Toxicology P. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate dihydrate (Cas No. 7789-12-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*(546): 1-192, 2008.
- Nies A.T., Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453(5): 643-59, 2007.
- Nouspikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66(6): 994-1009, 2009.
- Obmolova G., Ban C., Hsieh P., Yang W. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* 407(6805): 703-10, 2000.
- O'Donovan A., Davies A.A., Moggs J.G., West S.C., Wood R.D. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 371(6496): 432-5, 1994.

- OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* París (Francia), Ed. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2013.
- Okabe M., Szakacs G., Reimers M.A., Suzuki T., Hall M.D., Abe T., Weinstein J.N., Gottesman M.M. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol Cancer Ther* 7(9): 3081-91, 2008.
- Okano J., Matsumoto K., Nagahara T., Murawaki Y. Gefitinib and the modulation of the signaling pathways downstream of epidermal growth factor receptor in human liver cancer cells. *J Gastroenterol* 41(2): 166-76, 2006.
- Opperman T., Murli S., Smith B.T., Walker G.C. A model for a umuDC-dependent prokaryotic DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9218-23, 1999.
- Ortiz R., Melguizo C., Prados J., Alvarez P.J., Caba O., Rodriguez-Serrano F., Hita F., Aranega A. New gene therapy strategies for cancer treatment: a review of recent patents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 7(3): 297-312, 2012.
- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 291-8, 1984.
- Ougland R., Zhang C.M., Liiv A., Johansen R.F., Seeberg E., Hou Y.M., Remme J., Falnes P.O. AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol Cell* 16(1): 107-16, 2004.
- Pandita T.K. ATM function and telomere stability. *Oncogene* 21(4): 611-8, 2002.
- Pang E., Hu Y., Chan K.Y., Lai P.B., Squire J.A., Macgregor P.F., Beheshti B., Albert M., Leung T.W., Wong N. Karyotypic imbalances and differential gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* 85(5): 664-74, 2005.
- Pastor-Anglada M., Molina-Arcas M., Casado F.J., Bellosillo B., Colomer D., Gil J. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 18(3): 385-93, 2004.
- Patel T. Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3(1): 33-42, 2006.
- Payne A., Chu G. Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mutat Res* 310(1): 89-102, 1994.
- Peghini P.L., Iwamoto M., Raffeld M., Chen Y.J., Goebel S.U., Serrano J., Jensen R.T. Overexpression of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors in a proportion of gastrinomas correlates with aggressive growth and lower curability. *Clin Cancer Res* 8(7): 2273-85, 2002.
- Permenter M.G., Lewis J.A., Jackson D.A. Exposure to nickel, chromium, or cadmium causes distinct changes in the gene expression patterns of a rat liver derived cell line. *PLoS One* 6(11): e27730, 2011.
- Potter P.M., Wilkinson M.C., Fitton J., Carr F.J., Brennan J., Cooper D.P., Margison G.P. Characterisation and nucleotide sequence of ogt, the O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of E. coli. *Nucleic Acids Res* 15(22): 9177-93, 1987.
- Qadri I., Hu L.J., Iwahashi M., Al-Zuabi S., Quattrochi L.C., Simon F.R. Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). *Toxicol Appl Pharmacol* 234(3): 281-92, 2009.

- Qu L., Wang Y., Gong L., Zhu J., Gong R., Si J. Suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma cells by survivin promoter-driven expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Oncol Rep* 29(4): 1435-40, 2013.
- Quillardet P., Huisman O., D'Ari R., Hofnung M. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(19): 5971-5, 1982.
- Rebucci M., Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 85(9): 1219-26, 2013.
- Rivera-Calzada A., Spagnolo L., Pearl L.H., Llorca O. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO Rep* 8(1): 56-62, 2007.
- Rothstein R., Michel B., Gangloff S. Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* 14(1): 1-10, 2000.
- Rozenzweig M., von Hoff D.D., Slavik M., Muggia F.M. Cis-diamminedichloroplatinum (II). A new anticancer drug. *Ann Intern Med* 86(6): 803-12, 1977.
- Ryan B.M., O'Donovan N., Duffy M.J. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 35(7): 553-62, 2009.
- Samson L., Cairns J. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* 267(5608): 281-3, 1977.
- Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 103(6): 2203-37, 2003.
- Sancar G.B., Jorns M.S., Payne G., Fluke D.J., Rupert C.S., Sancar A. Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum. *J Biol Chem* 262(1): 492-8, 1987.
- Schlacher K., Leslie K., Wyman C., Woodgate R., Cox M.M., Goodman M.F. DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome. *Mol Cell* 17(4): 561-72, 2005.
- Schlacher K., Pham P., Cox M.M., Goodman M.F. Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. *Chem Rev* 106(2): 406-19, 2006.
- Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 31(1): 9-15, 1975.
- Schmutte C., Marinescu R.C., Sadoff M.M., Guerrette S., Overhauser J., Fishel R. Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2. *Cancer Res* 58(20): 4537-42, 1998.
- Schnarr M., Oertel-Buchheit P., Kazmaier M., Granger-Schnarr M. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* 73(4): 423-31, 1991.
- Sedgwick B., Bates P.A., Paik J., Jacobs S.C., Lindahl T. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* 6(4): 429-42, 2007.
- Sedgwick B., Robins P., Totty N., Lindahl T. Functional domains and methyl acceptor sites of the *Escherichia coli* ada protein. *J Biol Chem* 263(9): 4430-3, 1988.
- Serment-Guerrero J., Breña-Valle M., Espinosa-Aguirre J. La respuesta SOS en *Escherichia coli*. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8(2): 99-105, 2005.
- Shapiro N., Keasling J.D. The recA gene and cadmium toxicity in *Escherichia coli* K12. *Microbios* 86(346): 23-6, 1996.
- Sherman I.A., Fisher M.M. Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy. *Hepatology* 6(3): 444-9, 1986.

- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3(3): 155-68, 2003.
- Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. Singapur, Ed. World Scientific, 2006.
- Shivji K.K., Kenny M.K., Wood R.D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69(2): 367-74, 1992.
- Shrivastav M., De Haro L.P., Nickoloff J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18(1): 134-47, 2008.
- Sijbers A.M., de Laat W.L., Ariza R.R., Biggerstaff M., Wei Y.F., Moggs J.G., Carter K.C., Shell B.K., Evans E., de Jong M.C., Rademakers S., de Rooij J., Jaspers N.G., Hoesjmakers J.H., Wood R.D. *Xeroderma pigmentosum* group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* 86(5): 811-22, 1996.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184-91, 1988.
- Sinha R.P., Hader D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1(4): 225-36, 2002.
- Sode K., Ootera T., Shirahane M., Witarto A.B., Igarashi S., Yoshida H. Increasing the thermal stability of the water-soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by single amino acid replacement. *Enzyme Microb Technol* 26(7): 491-6, 2000.
- Song Y., Li G., Thornton S.F., Thompson I.P., Banwart S.A., Lerner D.N., Huang W.E. Optimization of bacterial whole cell bioreporters for toxicity assay of environmental samples. *Environ Sci Technol* 43(20): 7931-8, 2009.
- Sorensen S.J., Burmolle M., Hansen L.H. Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors. *Curr Opin Biotechnol* 17(1): 11-6, 2006.
- Sousa M.M., Krokan H.E., Slupphaug G. DNA-uracil and human pathology. *Mol Aspects Med* 28(3-4): 276-306, 2007.
- Srivenugopal K.S., Mullapudi S.R., Shou J., Hazra T.K., Ali-Osman F. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. *Cancer Res* 60(2): 282-7, 2000.
- Stockel B., Konig J., Nies A.T., Cui Y., Brom M., Keppler D. Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem* 267(5): 1347-58, 2000.
- Stucki M., Pascucci B., Parlanti E., Fortini P., Wilson S.H., Hubscher U., Dogliotti E. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17(7): 835-43, 1998.
- Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. Microbial biosensors: a review. *Biosens Bioelectron* 26(5): 1788-99, 2011.
- Sumikura K., Yano K., Ikebukuro K., Karube I. Thrombin-binding properties of thrombin aptamer derivatives. *Nucleic Acids Symp Ser*(37): 257-8, 1997.
- Summers K.C., Shen F., Sierra Potchanant E.A., Phipps E.A., Hickey R.J., Malkas L.H. Phosphorylation: the molecular switch of double-strand break repair. *Int J Proteomics* 2011: 373816, 2011.
- Suspiro A., Prista J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. *Toxicol Lett* 207(1): 42-52, 2011.

- Svejstrup J.Q. Rescue of arrested RNA polymerase II complexes. *J Cell Sci* 116(Pt 3): 447-51, 2003.
- Svoboda M., Wlcek K., Taferner B., Hering S., Stieger B., Tong D., Zeillinger R., Thalhammer T., Jager W. Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 in ovarian cancer cells: relevance for paclitaxel transport. *Biomed Pharmacother* 65(6): 417-26, 2011.
- Swindall A.F., Stanley J.A., Yang E.S. PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis? *Cancers (Basel)* 5(3): 943-58, 2013.
- Tamayo J., Kosaka P.M., Ruz J.J., San Paulo A., Calleja M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem Soc Rev* 42(3): 1287-311, 2013.
- Tanaka T., Uchiumi T., Hinoshita E., Inokuchi A., Toh S., Wada M., Takano H., Kohno K., Kuwano M. The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* 30(6): 1507-12, 1999.
- Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS* 101: 133-64, 2012.
- Thliveris A.T., Little J.W., Mount D.W. Repression of the *E. coli* recA gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie* 73(4): 449-56, 1991.
- Timur S., Haghghi B., Tkac J., Pazarlioglu N., Telefoncu A., Gorton L. Electrical wiring of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* with osmium redox polymers. *Bioelectrochemistry* 71(1): 38-45, 2007.
- Tirona R.G., Leake B.F., Merino G., Kim R.B. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 276(38): 35669-75, 2001.
- Tkac J., Sturdik E., Gemeiner P. Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised beta-galactosidase. *Analyst* 125(7): 1285-9, 2000.
- Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249(4968): 505-10, 1990.
- Tyagi R., Batra R., Gupta M.N. Amorphous enzyme aggregates: stability towards heat and aqueous organic cosolvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 348-54, 1999.
- Uddin A.N., Burns F.J., Rossman T.G., Chen H., Kluz T., Costa M. Dietary chromium and nickel enhance UV-carcinogenesis in skin of hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 221(3): 329-38, 2007.
- Unge A., Tombolini R., Molbak L., Jansson J.K. Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual gfp-luxAB marker system. *Appl Environ Microbiol* 65(2): 813-21, 1999.
- Urbano A.M., Ferreira L.M., Alpoim M.C. Molecular and cellular mechanisms of hexavalent chromium-induced lung cancer: an updated perspective. *Curr Drug Metab* 13(3): 284-305, 2012.
- Valverde M., Trejo C., Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* 16(3): 265-70, 2001.
- van der Wees C., Jansen J., Vrieling H., van der Laarse A., Van Zeeland A., Mullenders L. Nucleotide excision repair in differentiated cells. *Mutat Res* 614(1-2): 16-23, 2007.

- Van Dyk T.K., Majarian W.R., Konstantinov K.B., Young R.M., Dhurjati P.S., LaRossa R.A. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl Environ Microbiol* 60(5): 1414-20, 1994.
- Vavricka S.R., Jung D., Fried M., Grutzner U., Meier P.J., Kullak-Ublick G.A. The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 40(2): 212-8, 2004.
- Velasco-García M., Mottram T. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering* 84(1): 1-12, 2003.
- Venook A.P., Papandreou C., Furuse J., de Guevara L.L. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist* 15 Suppl 4: 5-13, 2010.
- Verma N., Singh M. A disposable microbial based biosensor for quality control in milk. *Biosens Bioelectron* 18(10): 1219-24, 2003.
- Vicens M., Medarde M., Macias R.I., Larena M.G., Villafaina A., Serrano M.A., Marin J.J. Novel cationic and neutral glycocholic acid and polyamine conjugates able to inhibit transporters involved in hepatic and intestinal bile acid uptake. *Bioorg Med Chem* 15(6): 2359-67, 2007.
- Visnes T., Doseth B., Pettersen H.S., Hagen L., Sousa M.M., Akbari M., Otterlei M., Kavli B., Slupphaug G., Krokan H.E. Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1517): 563-8, 2009.
- Vogelstein B., Kinzler K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10(8): 789-99, 2004.
- Wang T., Shankar K., Ronis M.J., Mehendale H.M. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther* 294(2): 473-9, 2000.
- Wang Z., Zhou X., Li J., Liu X., Chen Z., Shen G., Guan T., Ye N., Wei X., Huang N., Yang L., Wei Y. Suppression of hepatoma tumor growth by systemic administration of the phytotoxin gelonin driven by the survivin promoter. *Neoplasma* 60(5): 469-79, 2013.
- Wardelmann E., Thomas N., Merkelbach-Bruse S., Pauls K., Speidel N., Buttner R., Bihl H., Leutner C.C., Heinicke T., Hohenberger P. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *Lancet Oncol* 6(4): 249-51, 2005.
- Watanabe A., Yano K., Ikebukuro K., Karube I. Investigation of the potential active site of a cyanide dihydratase using site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1382(1): 1-4, 1998.
- Wyatt M.D. Advances in understanding the coupling of DNA base modifying enzymes to processes involving base excision repair. *Adv Cancer Res* 119: 63-106, 2013.
- Xu Y., Fang F., Ludewig G., Jones G., Jones D. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol* 23(9): 527-37, 2004.
- Xu-Welliver M., Pegg A.E. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 23(5): 823-30, 2002.
- Yamaguchi H., Kobayashi M., Okada M., Takeuchi T., Unno M., Abe T., Goto J., Hishinuma T., Mano N. Rapid screening of antineoplastic candidates for the

- human organic anion transporter OATP1B3 substrates using fluorescent probes. *Cancer Lett* 260(1-2): 163-9, 2008.
- Yamaguchi Y., Shiraki K., Fuke H., Inoue T., Miyashita K., Yamanaka Y., Saitou Y., Sugimoto K., Nakano T. Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein or survivin by short interfering RNAs sensitize hepatoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand- and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Oncol Rep* 14(5): 1311-6, 2005.
- Yamakawa Y., Hamada A., Shuto T., Yuki M., Uchida T., Kai H., Kawaguchi T., Saito H. Pharmacokinetic impact of SLCO1A2 polymorphisms on imatinib disposition in patients with chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 90(1): 157-63, 2011.
- Yamamoto H., Ngan C.Y., Monden M. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci* 99(9): 1709-14, 2008.
- Yan X., Xu X.K., Ji H.F. Glucose oxidase multilayer modified microcantilevers for glucose measurement. *Anal Chem* 77(19): 6197-204, 2005.
- Yasuda T., Morimatsu K., Horii T., Nagata T., Ohmori H. Inhibition of Escherichia coli RecA coprotease activities by DinI. *EMBO J* 17(11): 3207-16, 1998.
- Yasuda T., Morimatsu K., Kato R., Usukura J., Takahashi M., Ohmori H. Physical interactions between DinI and RecA nucleoprotein filament for the regulation of SOS mutagenesis. *EMBO J* 20(5): 1192-202, 2001.
- Zhang A.P., Pigli Y.Z., Rice P.A. Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature* 466(7308): 883-6, 2010.
- Zhukov N.V., Tjulandin S.A. Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory. *Biochemistry (Mosc)* 73(5): 605-18, 2008.
- Zimmerman E.I., Hu S., Roberts J.L., Gibson A.A., Orwick S.J., Li L., Sparreboom A., Baker S.D. Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide. *Clin Cancer Res* 19(6): 1458-66, 2013.
- Zollner G., Wagner M., Fickert P., Silbert D., Fuchsbichler A., Zatloukal K., Denk H., Trauner M. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 25(2): 367-79, 2005.